

İleri Evre Mide Karsinomlarında p53 İmmunreaktivitesi, Hücre Proliferasyon Hızı ve Mikrodamar Yoğunluğunun Patolojik Evre ile İlişkisi

THE RELATION OF TUMORAL p53 IMMUNOREACTIVITY, CELL PROLIFERATION RATE AND MICROVESSEL DENSITY WITH THE PATHOLOGICAL STAGE IN ADVANCED STAGE GASTRIC CARCINOMA

Dr.Mine G.GÜLLÜOĞLU, Dr.Nurcan KILIÇLI ÇAMUR,
Dr.Sümer YAMANER*, Dr.Ferhunde DİZDAROĞLU

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Patoloji ABD, (*) Genel Cerrahi ABD, İSTANBUL

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, ileri evre mide karsinomlarında immunhistokimyasal yöntem ile tümöral hücrelerdeki p53 tümör baskılayıcı gen proteini ve PCNA (proliferating cell nuclear antigen) varlığı ile tümördeki mikrodamar yoğunluğunu belirlemeyi planladık. Bu parametrelerin tümörün patolojik evresi ve morfolojik özellikleri ile korelasyonunu ortaya koymayı amaçladık.

Durum değerlendirmesi: Tüm dünyada mortalite oranı yüksek olan ileri evre mide karsinomlarının prognozunu belirlemede günümüzdeki en geçerli faktör patolojik evredir. Buna ek olarak, tümörün bazı morfolojik özellikleri de yardımcı prognostic faktörler olarak kabul edilmektedir. Ancak prognozu yansıtabilecek ve isabetli primer tedavi seçiminde yol gösterebilecek preoperatif dönemde de saptanabilen yeni parametrelere ihtiyaç vardır.

Yöntem: Mide karsinomu nedeniyle opere olan 43 hastanın gastrektomi materyallerinin arşiv raporları ve histolojik preparatları incelenerek tümörler makroskopik ve mikroskopik özellikleri ile ve evrelerine göre sınıflandırıldı. Her materyalden seçilen birer paraffin bloktaki tümör dokusuna, p53, PCNA ve CD34 antijenlerine yönelik immunhistokimyasal işlemler uygulandı. Tümörler p53 immunreaktivitelerine göre pozitif ve negatif olarak gruplandırıldı. Nükleer bir protein olan ve hücre proliferasyonunu yansıtan PCNA'ya karşı antikor ile immunreaktivite gösteren tümör hücrelerinin 1000 tümör hücresine oranı PCNA indeksi olarak saptandı. Endotel hücreleri anti-CD34 antikoruna ile işaretlendikten sonra en yoğun küçük çaplı vasküler yapı içeren bölgelerde immünreaktif hücre ve hücre grupları sayıldı. Elde edilen değerlerin ortalamalarının alınması ile anjiogenez indeksi belirlendi. Elde edilen sonuçlar, tümörlerin histopatolojik özellikleri ve evreleri ile karşılaştırıldı.

Çıkarımlar: Evre IV gastrik karsinomlarda, diğer evrelerdeki tümörlere göre p53 immünreaktivitesinin ve PCNA indeksinin daha yüksek olduğu saptandı. Ülseratif ve diffüz infiltratif tipte gelişen tümörlerin polipoid ve fungatif tiptekilere göre daha yüksek PCNA indeksine sahip olduğu gözlemlendi. Tümörlerin mikrodamar yoğunluğunu gösteren anjiogenez indeksi ise sadece tümörlerin mikroskopik yapısı ile istatistiksel olarak ilişkili bulundu. Mikrodamar yoğunluğunun proliferatif aktiviteyi yansıtan PCNA indeksi ile paralel bir artış gösterdiği saptandı.

Sonuç: Bu immunhistokimyasal markerların tümör evresini saptamada yardımcı olabileceği düşünülebilir. Bütün bu bulgular ışığında, preoperatif evrelemenin bir komponenti olarak bu biyolojik parametrelerin

saptanması, hastaların gerek prognozunun gerekse tedavi seçeneklerinin (neoadjuvan kemoterapi ya da primer cerrahi) daha isabetli olarak değerlendirilmesine katkıda bulunacaktır.

Anahtar kelimeler: Mide kanseri, patolojik evre, p53 proteini, PCNA, tümör anjiogenezi

SUMMARY

As it is universally accepted, pathological staging is the primary prognostic determinant for advanced gastric carcinoma which is associated with high mortality. Moreover, some morphological features of the primary tumor have adjunctive prognostic importance. More distinct histological parameters, which can be detected preoperatively, would help to assess the prognosis and to decide the primary treatment modality more precisely. This study was performed to determine the expressions of p53 tumor suppressor gene protein, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and microvessel density in advanced gastric cancers by immunohistopathological methods. The impact of these parameters on staging and morphological features of the tumor was also determined. Forty-three patients who were operated upon the diagnosis of gastric cancer are included in the study. The clinical records, operation notes, specimen reports and histological slides of each patient were obtained retrospectively. Tumors were grouped according to their pathological stages, and also to their macroscopic and microscopic features. One paraffin block of each tumor was selected to be assessed for their p53, PCNA and CD34 expressions by immunohistochemical methods. Tumors were further divided into either negative or positive groups according to their p53 immunoreactivity. Separately, PCNA index was determined for each tumor by calculating the ratio of tumor cells which has immunoreactivity with the monoclonal antibody against PCNA over 1000 tumor cells at any site on the slide. The endothelial cells were highlighted by anti-CD34 antibody and this procedure was followed by calculation of angiogenesis index by counting the immunoreactive cell groups at areas involving the most distinct small sized vascular structure expression. As a result, in stage IV gastric carcinomas, p53 immunoreactivity and PCNA index were found to be significantly high when compared to other stages. We observed significantly higher PCNA index in tumors of ulcerative and diffuse infiltrative type when compared to polypoid and fungating types. There was a significant increase in angiogenesis index which was similar to the elevation of PCNA index in advanced stages of gastric carcinomas. These immunohistochemical markers may be useful in determining the stage of the tumor. In the light of these findings, we state that detecting these biological parameters may be helpful in having an idea about the prognosis and deciding on the most appropriate primary treatment modality.

Keywords: Gastric cancer, pathological stage, p53 protein, PCNA, tumor angiogenesis

Günümüzde en sık rastlanan ölümcül kanser türlerinden biri olan mide kanserinin (1) batı ülkelerinde kanser nedenli ölümler arasında ikinci sırada gelmektedir (2). Bu ülkelerde operasyon sonrası 5 yıllık yaşam oranı %20 ile %45 arasında değişmektedir (2,3). Prognozun kötü olmasının birincil nedeni, hastaların büyük çoğunluğunda tanı konduğu sırada tümörün ileri evrede olmasıdır (4). İleri evre hastalarda 5 yıllık yaşam oranı %17 iken (4), tümörün mukoza ve submukozada sınırlı olduğu erken evredeki tümörlerde ise cerrahi tedavi sonrası 5 yıllık yaşam oranı %88 ile %95 arasında değişmektedir (5,6). Bugün, hala tümörün cerrahi operasyon sırasındaki patolojik evresi en önemli prognostik faktör olarak kabul edilmektedir (1,5,7). Hasta yaşı, tümörün lokalizasyonu, makroskopik yapısı ve histolojik patterni gibi diğer klinikopatolojik özellikler prognozu belirlemede sınırlı değer

taşımaktadır (8). Yeterli ve doğru preoperatif tümör evrelemesi, hastanın prognozunu ve bunun yanı sıra rekürrens olasılığını ortaya koyabilir. İyi yapılmış bir evreleme ile hastalara primer olarak uygulanacak tedavinin seçimi daha objektif olarak yapılabilecektir. Bu durumda, ileri evredeki bazı hastalar için neoadjuvan kemoterapi primer tedavi olarak seçenek dahilinde olabilecektir. Preoperatif dönemde de saptanabilecek ve prognozu yansıtabilecek yeni parametrelere ihtiyaç vardır.

İnsan kanser türlerinde en sık rastlanan mutasyon olan tümör baskılayıcı gen mutasyonu varlığının, mide kanseri de dahil olmak üzere birçok tümörde prognostik değeresahip olduğunu gösteren klinik ve patolojik çalışmalar mevcuttur (9). p53 gen mutasyonu varlığını, dokuda p53 proteinini immunhistokimyasal yöntem ile göstererek indirekt olarak belirlemek çalışmalarda sık kullanılan bir

TABLO 1: İMMUNHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMADA KULLANILAN PRİMER ANTİKORLAR

	ÜRETİM	KLON	DİLÜSYON	İNKÜBASYON
p53	Novocastra Labs. New Castle, İngiltere (NLC-p53-DO7)	DO-7	1/40	60 dakika
CD34	Biogenex San Ramon, CA, ABD (MU236-UC)	QBEnd/10	1/20	60 dakika
PCNA	Neomarkers Union City, CA, ABD (MS-106-S1)	PC10	1/200	30 dakika

İnkübe edilen kesitler üzerine, sekonder antikor olarak 25 dakika süreyle biotinlenmiş keçi anti-fare IgG sekonder antikorunu (UltraVision-LabVision Corporation, Union City, CA, ABD- TM-060-HL) ve ardından, işaret (label) olarak yine 25 dakika süreyle peroksidaz konjuge streptavidin (UltraVision Streptavidin/HRP, LabVision Corporation, Union City, CA, ABD- TM-060-HL) uygulandı. Bütün uygulamalar oda sıcaklığında yapılmış, her uygulama sonrası kesitler PBS solüsyonu ile yıkanmıştır. İmmunreaksiyonu gözlemlemek amacıyla AEC (3-amino-9-etilkarbazol) kromojen sistemi (LabVision Corporation, Union City, CA, ABD- TA-060-HA) kullanıldı. Kesitlerin çeşme suyu ve distile su ile yıkanmasının ardından zıt boya olarak Mayer hematoksilen uygulandı.

İmmunhistokimyasal değerlendirme

Bütün mikroskopik immünhistokimya incelemeleri X4, X10, X40 ve X100 achromatic objektifler ve 10X-T/18L okülerler içeren Olympus CH-2 model ışık mikroskobu ile yapıldı.

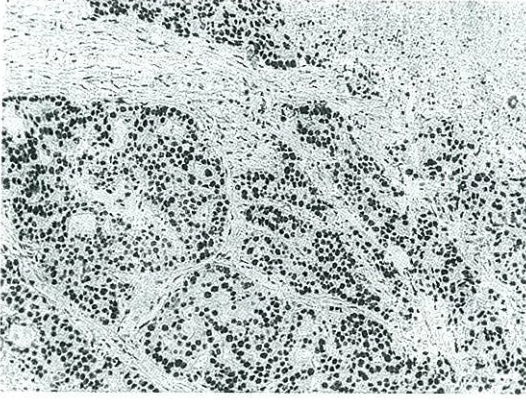
İmmunhistokimyasal çalışma sonuçları değerlendirilirken tümördeki nekrotik bölgeler (eğer varsa) ve dokuların kenar bölgelerindeki boyanmalar yanlış pozitif olma olasılığı göz önünde tutularak değerlendirmeye alınmadı.

p53 immünreaktivitesi tümörlerde oldukça değişken bir boyanma patterni sergiledi. Hiç boyanma görülmeyen ya da tek tek seyrek hücre nükleuslarında izlenen boyanmanın yanı sıra diffüz ve kuvvetli nükleer immünreaktivitenin gözlemlendiği tümörlere rastlandı. Boyanma yoğunluğu ve dağılımı bu iki uç nokta arasında değişiklik gösteriyordu. Boyanmanın görülmediği, sadece arada

seyrek tek tek hücrelerde ya da fokal zayıf immün boyanmanın izlendiği vakalar negatif, kesitlerin %25'inden daha yaygın olarak orta derecede, fokal kuvvetli ve kuvvetli immün boyanma gösteren vakalar pozitif kabul edildi.

PCNA nükleer bir antijen olduğundan, anti-PCNA antikorunu ile immünhistokimyasal olarak boyanan kesitlerde, sadece hücrelerin nükleuslarında immünboyanma izlendi. Boyanmalar büyük ölçüde granüler yapıda olup, boyanma yoğunluğu hücreden hücreye değişmekteydi. Gözlemlenen tüm nükleer boyanmalar yoğunluğuna bakılmaksızın pozitif olarak değerlendirildi. En fazla pozitivitenin gözlemlendiği gelişigüzel olarak seçilen bölgelerde 1000 hücre içinde pozitif boyanan nükleuslar sayıldı. Pozitif immün-boyanma gösteren hücrelerin yüzdesi PCNA indeksi (Pi) olarak belirlendi.

Damarlar anti-CD34 antikorunu ile immünhistokimyasal olarak işaretlendikten sonra, kesitlerin geneli 40X ve 100X büyütme ile incelenerek, en fazla mikrovasküler yapı içeren bölgeler belirlendi. Bu bölgelerde bulunan damarlar 400X büyütmede 10 alanda sayıldı. Sayım yapılırken, lumen varlığına bakılmaksızın pozitif boyanma gösteren hücreler ve hücre toplulukları değerlendirildi. Sayım yapılan alanlarda birbirleri ile devamlılık gösterme şartı aranmadı. İncelemede kullanılan Olympus CH-2 model ışık mikroskobunda bir büyük büyütme alanı (40X objektif + 10X oküler = 400X) 0,151 mm²'ye eşit olduğundan değerlendirme toplam 10 büyük büyütme alanına eşit olan 1.151 mm²'lik bir bölgede yapıldı. Sayımın ardından her alanın sayım sonucu toplanarak alan başına düşen vasküler yapı sayısı olan ortalama değer alındı. Bu değer anjiyogenez indeksi (Ai) olarak kabul edildi.



Resim 1: Orta derecede diferansiye intestinal tipte mide karsinomunda, tümör hücrelerinde yoğun nükleer p53 immunpozitifliği. (p53, zıt boya Mayer Hematoksilen, X125)

İstatistiksel değerlendirme

Proliferasyon indeksi (Pi) ile anjiogenez indeksi (Ai) arasında korelasyon Pearson korelasyon katsayısı testi ile değerlendirildi. Gruplar ile Ai ve Pi arasındaki ilişkiler için tek yönlü ANOVA testi, hipo-hiper vasküler ve hipo- hiperproliferatif tümör grupları ile diğer parametre grupları arasındaki ilişkiler için de χ^2 testi kullanıldı. Tüm istatistiksel değerlendirmeler Windows '95 altında çalışan SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 6.0 programı kullanılarak yapıldı.

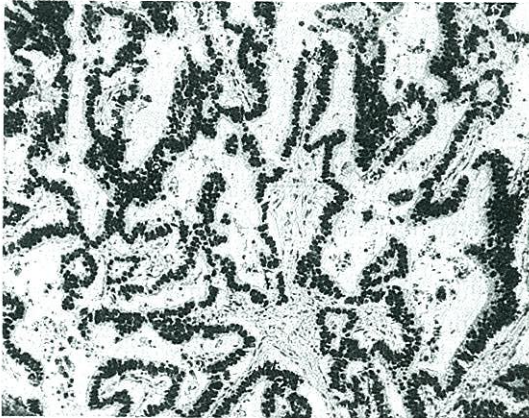
BULGULAR

İleri evre mide karsinomlu 43 vakanın genel klinik ve patolojik parametreleri ile p53 immün-

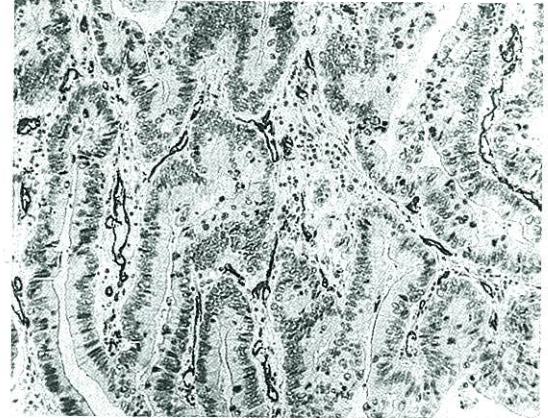
reaksiyonu, PCNA indeksi ve anjiogenik aktivitesi arasındaki ilişkiler Tablo 2, 3 ve 4'te gösterilmiştir.

Tümörlerin %51.2'si (n = 22) p53 immunreaktivitesi göstermezken, %48.8'inde (n = 21) p53 immunreaktivitesi izlenmekteydi. PCNA indeksi 27.4 ile 94 arasında değişiyordu ve ortalaması $67.74 (\pm 18.31)$ idi. Anjiogenez indeksi (Ai), 43 tümörde 14.6 ile 108 arasında değişim gösteriyordu ve Ai ortalaması $53.18 (\pm 21.97)$ idi. Bu sayı sınır değer kabul edilerek tümörler hipovasküler (Ai > 53) ve hipervasküler (Ai > 53) olarak iki gruba ayrıldığında, tümörlerden 26'sı (%60) hipovasküler, 17'si (%40) hipervasküler gruba girdi.

Ülseratif ve diffüz infiltratif tipteki (Borrmann Tip III ve IV) mide karsinomlarının, nodüler olanlara (Borrmann Tip I ve II) oranla daha sık olarak



Resim 2 a: İyi diferansiye intestinal tipte mide karsinomunda yoğun PCNA (proliferating cell nuclear antigen) immunpozitifliği. (PCNA, zıt boya Mayer Hematoksilen, X125)



Resim 2 b: Aynı tümörde, stromal mikrodamarların anti-CD34 antikoruna ile immunhistokimyasal olarak işaretli görünümü. (CD34, zıt boya Mayer Hematoksilen, X125)

TABLO 2: p53 İMMUNREAKSİYONU İLE KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELER ARASINDAKİ İLİŞKİ

DEĞİŞKEN	SAYI(%)	P53 NEGATİF(%)	P53 POZİTİF(%)	P
Toplam	43(100)	22(51.2)	21 (48.8)	
Yaş				
< 50	13(30)	8(61.5)	5(38.5)	AD
> 50	30(70)	14(46.7)	16(53.3)	
Cinsiyet				
Erkek	28(65)	16(57.1)	12(42.9)	AD
Kadın	15(35)	6(40)	9(60)	
Tümör Lokalizasyonu				
Fundus-Korpus	20(46.5)	9(45)	11(55)	
Antrum	22(51)	13(59)	9(41)	AD
Linitis Plastica	1(2.5)	0(0)	1(100)	
Tümör Çapı				
< 5	16(39.2)	9(56.2)	7(43.8)	AD
> 5	27(60.8)	13(48.1)	14(51.9)	
Makroskopik Tip (Borrmann)				
Polipoid-Fungatif(TipI-II)	19(44)	14(73.7)	5(26.3)	0.01
Ülseratif-Diffüz inf.(Tip III-IV)	24(56)	8(33.3)	16(66.7)	
Mikroskopik Tip				
Papiller	6(14)	2(33.3)	4(66.7)	
Tübüler	16(37.2)	10(62.5)	6(37.5)	
Az diferansiye	12(27.9)	5(41.7)	7(58.3)	AD
Müsinöz	4(9.3)	2(50)	2(50)	
Taşlı Yüzük Hücreli	5(11.6)	3(60)	2(40)	
Lauren Sınıflaması				
İntestinal	19(44.2)	10(52.6)	9(47.4)	
Diffüz İnfiltran	19(44.2)	10(52.6)	9(47.4)	AD
Mikst	5(11.6)	2(40)	3(60)	
Diferansiasyon				
İyi-orta Diferansiye	26(60.4)	14(53.8)	12(46.2)	AD
Az diferansiye	17(39.6)	8(47)	9(53)	
Tümörün İnvazyon Derinliği				
T3	31(72)	18(58)	13(42)	AD
T4	12(28)	4(33.3)	8(66.7)	
Lenf Gangliyonu Tutulumu				
N0	10(23.3)	6(60)	4(40)	
N1-N2	33(76.7)	16(48.5)	17(51.5)	AD
Uzak Metastaz				
M0	34(79)	20(58.8)	14(41.2)	0.05
M1	9(21)	2(22.2)	7(77.8)	
TNM Evresi				
IIA	9(20.9)	6(66.7)	3(33.3)	
IIIA	15(34.9)	7(46.7)	8(53.3)	AD
IIIB	10(23.3)	7(70)	3(30)	
IV	9(20.9)	2(22.2)	7(77.8)	
Lenfatik Damar İnvazyonu				
Negatif	2(4.6)	1(50)	1(50)	AD
Pozitif	41(95.4)	21(51.2)	10(64.3)	
Venöz Damar İnvazyonu				
Negatif	23(53.4)	14(60.8)	9(39.2)	AD
Pozitif	20(46.6)	8(40)	12(60)	
Proliferasyon İndeksi				
Düşük (< 67)	16(37.2)	12(75)	4(25)	0.017
Yüksek (> 67)	27(62.8)	10(37)	17(63)	
Anjiogenez İndeksi				
Düşük (< 53)	26(60)	13(50)	13(50)	AD
Yüksek (> 53)	17(40)	9(52.9)	8(47.0)	

AD:Anlamli değil

p53 immunreaktivitesi gösterdiği ($p < 0.05$) ve daha yüksek bir hücre proliferasyon hızına sahip olduğu ($p < 0.05$) sonucuna varıldı. Tümörlerin anjiogenik aktivitesi makroskopik tipten bağımsız idi ($p > 0.05$).

Lauren'in mikroskopik tümör tiplerinden diffüz infiltran tipteki tümör grubunda Aİ ortalaması (61.36 ± 23.45), intestinal ve mikst tipteki tümörlerin Aİ ortalamalarından (sırasıyla 45.95 ± 20.26 ve 49.52 ± 12.86) daha yüksekti. Diffüz infiltran tipteki tümörlerin ($n = 19$) %63'ü ($n = 12$) hipervasküler (Aİ > 53) iken, intestinal tip tümörlerin ($n = 19$) %21'i ($n = 4$), mikst tiptekilerin ($n = 5$) %20'si ($n = 1$) bu grupta yer almaktaydı. Bu şekilde diffüz infiltran tipteki tümörlerin daha yoğun anjiogenetik aktiviteye sahip olduğu saptandı ($p < 0.05$). Az diferansiye tümörler de, iyi-orta derecede diferansiye tümörlerden daha yüksek bir anjiogenik aktiviteye sahip idi ($p < 0.05$). Tümörlerin p53 immunreaktivitesi ve hücre proliferasyon hızı ise mikroskopik yapı ile ilişkili değildi ($p < 0.05$).

Her ne kadar çevre organ invazyonu (T4) ve lenf gangliyonu metastazı olan (N1-N2) tümörlerin, p53 immunreaktivitesi gösterme eğilimi olduğu dikkati çekse de, bu eğilim istatistiksel anlam taşımamaktaydı ($p > 0.05$). Uzak metastaz varlığı ile p53 immunreaktivitesi arasındaki ilişki istatistiksel açıdan sınırdan anlamlı olarak değerlendirilirken ($p = 0.05$), TNM evresi p53 immunreaktivitesinden bağımsız idi ($p > 0.05$). TNM evresi, uzak metastaz varlığında Pİ'nin daha yüksek olmaya eğilimi nedeniyle proliferatif aktivite ile korelasyon gösteriyordu ($p < 0.05$). Lenf gangliyonu tutulumu gösteren N1 ve N2 evrelerindeki tümörlerin ($n = 33$) Pİ ortalamasının (70.67 ± 18.31), N0 evresindeki tümörlerin ($n = 10$) Pİ ortalamasından (58.63 ± 19.66) daha yüksek olduğu saptandı. Ancak bu sonuç istatistiksel anlam taşımamaktaydı ($p > 0.05$). Patolojik evre ilerledikçe, gerek evre gruplarının Aİ ortalamalarındaki yükselme, gerekse hipervasküler tümörlerin yüzdesindeki artış, tümör damarlanmasının artışı işaret etse de, bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$).

Yüksek PCNA indeksine sahip tümörlerin p53 immunreaktivitesi gösterme olasılığının düşük PCNA indeksli tümörlerden daha fazla olduğu saptandı ($p < 0.05$). p53 immunreaktivitesi ile, PCNA immunreaktivitesinin yansıttığı proliferatif aktivite paralellik göstermekteydi ($p < 0.05$).

Tümörlerin p53 immunreaktivitesinin, proliferasyon hızının ve mikrodamar yoğunluğunun, hastaların yaş ve cinsiyetinden, tümör lokalizasyo-

nundan ve çapından bağımsız olduğu sonucuna varıldı ($p > 0.05$).

PCNA indeksi olarak değerlendirilen proliferasyon hızı ile anjiogenez indeksi olarak değerlendirilen intratümöral mikrodamar yoğunluğu birbirlerine paralel bir artış göstermekteydi. Tümörlerin proliferasyon indeksleri ile anjiogenez indeksleri karşılaştırıldığında aralarında %32 oranında düşük bir ilişki olduğu belirlendi ($p < 0.05$).

TARTIŞMA

p53 tümör baskılayıcı gen anomalileri, mide kanserlerindeki genetik değişimler arasında en sık rastlanılanıdır (20,21,22). İleri evre tümörlerin gastrektomi materyalleri üzerinde yapılan bu araştırmada, %48,8 oranında p53 immunreaktivitesine rastlandı. Joachim ve arkadaşları da ileri evre mide adenokarsinomlarında yaptıkları bir çalışmada %24 oranında p53 immunreaktivitesi saptamışlardır (23). Kaynaklarda bu gene ait mutasyonların, mide kansinomlarında ortalama %41 oranında olduğu bildirilmektedir (9). p53 gen mutasyonları, tümör gelişiminin en erken dönemlerinde bile gözlenmiştir. İntestinal tip kanserlerin hem erken hem geç evrelerinde, %40 oranında p53 gen mutasyonu varlığı bildirilmiştir. p53 mutasyonu sıklığının erken ve geç evre gastrik kansinomlarda aynı olması nedeniyle, bu mutasyonun gastrik kansinogeneze erken bir olay olduğu savunulmaktadır (20). Bu iddiadan farklı olarak, ise ağır displaziden erken gastrik kansinoma ve ileri evre gastrik kansinoma doğru p53 immunreaktivitesinin dereceli olarak arttığını belirten Brito ve arkadaşlarının, erken evre gastrik kansinomlarda (T1) saptadıkları pozitif p53 immunreaktivitesi oranı, ileri evre kansinomlarda saptadıklarından daha düşüktür. Lenf gangliyonu tutulumu gösteren erken evre tümörlerde yüksek p53 immunreaktivite oranına sahiptir. Brito ve arkadaşları, kendi sonuçları ışığında p53 anomalilerinin tümör progresyonu ile ilişkili olduğunu savunmaktadırlar (12). Biz de çevre organ invazyonu gösteren tümörlerin (T4) göstermeyenlerden (T3), lenf gangliyonu tutulumu olanların (N1-2) olmayanlardan (N0) ve uzak organ metastazı yapanların (M1) yapmayanlardan (M0) daha yüksek oranda p53 immunreaktivitesi gösterdiğini saptadık. Bu bulgularımız p53 immunpozitifliğinin ileri evre tümörlerde de tümör progresyonu ile ilişkili olduğu hipotezini desteklemektedir.

Çalışmamızda, proliferasyon hızını yansıtan

TABLO 3: PCNA İNDEKSİ İLE KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELER ARASINDAKİ İLİŞKİ

DEĞİŞKEN	SAYI(%)	PCNA İNDEKSİ ORT	SD	P
Toplam	43(100)	87.74	18.31	
Yaş				
< 50	13(30)	83.78	18.33	AD
> 50	30(70)	69.45	18.34	
Cinsiyet				
Erkek	28(65)	66.46	18.27	AD
Kadın	15(35)	70.12	18.78	
Tümör Lokalizasyonu				
Fundus-Korpus	20(46.5)	69.9	16.33	
Antrum	22(51)	65.31	20.35	AD
Linitis Plastika	1(2.5)	77.9		
Tümör Çapı				
< 5	16(39.2)	67.7	21.08	AD
> 5	27(60.8)	67.76	16.89	
Makroskopik Tip (Borrmann)				
Polipoid-Fungatif(TipI-II)	19(44)	61.57	21.43	0.048
Ülseratif-Diffüz inf.(Tip III-IV)	24(56)	72.62	14.02	
Mikroskopik Tip				
Papiller	6(14)	49.98	19.06	
Tübüler	16(37.2)	70.07	17.99	AD
Az diferansiye	12(27.9)	72.12	17.43	
Müsinöz	4(9.3)	73.35	11.62	
Taşlı Yüzük Hücreli	5(11.6)	66.44	19.52	
Lauren Sınıflaması				
İntestinal	19(44.2)	63.75	19.65	AD
Diffüz İnfiltran	19(44.2)	67.43	17.21	
Mikst	5(11.6)	84.04	6.45	
Diferansiyasyon				
İyi-orta Diferansiye	26(60.4)	65.94	18.85	AD
Az diferansiye	17(39.6)	70.46	17.65	
Tümörün İnvazyon Derinliği				
T3	31(72)	66.42	18.58	AD
T4	12(28)	71.13	17.94	
Lenf Gangliyonu Tutulumu				
N0	10(23.3)	58.63	19.66	AD
N1-N2	33(76.7)	70.67	18.31	
Uzak Metastaz				
M0	34(79)	65.36	19.13	0.037
M1	9(21)	76.7	11.68	
TNM Evresi				
IIA	9(20.9)	55.66	18.34	
IIIA	15(34.9)	73.34	16.8	0.031
IIIB	10(23.3)	62.13	19.8	
IV	9(20.9)	76.7	11.67	
Lenfatik Damar İnvazyonu				
Negatif	2(4.6)	50.2	32.24	AD
Pozitif	41(95.4)	60.59	17.6	
Venöz Damar İnvazyonu				
Negatif	23(53.4)	64.98	20.62	AD
Pozitif	20(46.6)	70.91	15.14	

SD: Standart deviasyon

AD:Anlamli değil

PCNA indeksinin de, beklendiği gibi, tümör evresi ile paralellik gösterdiğini saptadık. Evre ilerledikçe tümördeki PCNA indeksi de artış göstermekteydi. Bu artış daha çok uzak metastaz varlığı ve lenf gangliyonu tutulumuna bağlıydı. Yonemura ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada PCNA indeksi ile belirledikleri proliferasyon hızı ile evre arasında ilişki olduğunu belirtmektedirler (24). Yüksek PCNA indeksinin gastrik karsinomlarda kötü prognoz işareti olarak kabul edilebileceği, araştırmalarda elde edilen sonuçlar arasındadır (14). PCNA indeksinin evre ve prognoz gibi faktörler ile ilişkili olmasının sadece tümör hücre sayısı artışının hızı ile bağlantılı olmadığı, ayrıca tümörün daha agresif olduğunu da gösterdiği kabul edilebilir.

Tümörlerin mikrodamarlanmasına yönelik incelemelerimizde ise, T4 evresindeki tümörlerin T3 evresindekilerden, N1 ve N2 evresinde olanların N0 evresinde olanlardan ve uzak metastaz yapanların (M1) yapmayanlardan (M0) daha yoğun mikrodamarlanma gösterdiğini gözlemledik. Bu sonuçlarımız her ne kadar istatistiksel anlam taşımaları da, tümör damarlanmasının tümör progresyonunda, özellikle de uzak metastaz gelişiminde önemli rol oynadığı yönündeki araştırma sonuçlarını (6,25,26,27,28,29,30,31) desteklemektedir. Tümör invazyon kapasitesinin hipervasküler tümörlerde daha yüksek olması, gelişmekte olan kapiller damarlardaki endotel hücrelerinden adhezyon moleküllerinin ve ekstrasellüler matriksi parçalama işlevini gören proteinazların salgılanmasına (32) bağlanabilir. Parçalanan ekstrasellüler matriks, tümör hücrelerinin üreyerek ilerleyebileceği uygun bir ortam yaratır. Vaskülarizasyon arttıkça tümör hücrelerinin dolaşıma katılma olasılığı da artmaktadır. Yeni oluşan kapillerlerin fragmante bazal membranları damarın tümör hücrelerine daha geçirgen olmasını sağlar. Bu şekilde, hipervasküler tümörlerde yeni damarların bu özelliği nedeniyle metastaz daha kolay gerçekleşir (33,34).

PCNA indeksi ile anjiogenik aktivite arasında korelasyon varlığı da bulgularımızdan biriydi. Bu ilişkiyi tümör içi büyüme faktörleri varlığı ile açıklamak mümkün olabilir. Tümör hücreleri ile onların beslenmesini sağlayan tümör içi damarların endotel hücreleri arasında parakrin bir etkileşme vardır (33). Bu sistemde, tümör içi kapiller endotel hücreleri salgıladıkları büyüme faktörleri ile tümör büyümesi üzerinde etkin olabilmektedirler. Prevasküler dönemden çıkıp anjiogenik hale gelen bir tümör, bu parakrin etkinin varlığı sayesinde hızlı bir büyüme kapasitesine sahip olur (33). PCNA

indeksi ile anjiogenik aktivite arasında bulunduğumuz paralellik bunu destekleyen bir bulgudur.

Araştırdığımız immunhistokimyasal parametreler, tümörlerin morfolojik özellikleri ile karşılaştırıldığında; Borrmann tip III ve tip IV (ülseratif ve diffüz infiltratif) tümörlerin, lumen içine doğru nodüler büyüyen Borrmann tip I ve tip II (polipoid ve fungatif) tümörlerden daha yüksek oranda p53 immunreaktivitesi göstermesi dikkat çekici bir bulgu olarak karşımıza çıktı. İlginç olarak, erken gastrik karsinomlar üzerinde yapılan çalışmalarda da mide duvarında derine doğru büyümeye eğilimli olan tümörlerde, yani deprese ve ekskave tipteki (tip IIc ve III) erken karsinomlarda daha yüksek oranda p53 immunreaktivitesi saptanmıştır (12,13,35). Çalışmamızın sonucunda Borrmann tip III ve IV tümörlerde, tip I ve II tümörlerden daha yüksek oranda p53 immunreaktivitesine rastlanması, erken gastrik karsinomlarda saptanan bu bulguların, ileri evre tümörler için de geçerli olduğunu işaret etmektedir.

PCNA indeksinin Borrmann makroskopik tipleri arasında belirgin fark sergilemesi, tümör morfolojisi açısından ulaştığımız diğer bir sonuç idi. Ülseratif ve diffüz infiltratif büyüme patterni gösteren (Borrmann tip III ve IV) tümörlerin PCNA indeksi, polipoid ve fungatif (Borrmann tip I ve II) olanlara göre daha yüksekti. Tümör hücrelerindeki proliferasyon hızı ile tümör büyümesi arasındaki ilişki göz önüne alınacak olursa (36), yavaş büyüyen tümörlerin lumen içine doğru gelişmeye eğilimli olduğu sonucuna varılabilir.

Nükleer fosfoprotein p53, inaktive olduğunda hücre çoğalması üzerindeki kontrolünü kaybeder (9,37). PCNA immunreaktivitesinden yararlanarak belirlediğimiz hücre proliferasyon hızının yüksek olması ile p53 immunreaktivitesi arasında saptadığımız korelasyon da bunu destekleyen bir bulgudur. Ioachim ve arkadaşları da bu bulgumuza paralel bir sonuç elde etmişlerdir (23).

Immunhistokimyasal yöntem ile boyanan kesitlerin incelenmesinde dikkati çeken bir özellik, antijen ekspresyonunun az ya da çok heterojen yapıda olmasıydı. Bu heterojenite, hücrelerin p53 immunreaktivitesinde daha az oranda gözlenirken, PCNA immunreaktivitesinin tümör genelinde yoğun ve seyrek olduğu bölgeler mevcuttu. CD34 antikoru ile işaretlenen endotel hücrelerinin ise kesit genelinde daha yoğun heterojenite gösterdiği izlenmekteydi. Bu nokta bu tür araştırmalarda immunhistokimya uygulanacak olan dokunun seçiminin önemini ortaya koymaktadır. Ancak, her ne kadar heterojen yapıda olsa da bir tümöre ait

TABLO 4: ANJİOGENİK AKTİVİTE İLE KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELER ARASINDAKİ İLİŞKİ

DEĞİŞKEN	SAYI(%)	P53 NEGATİF(%)	P53 POZİTİF(%)	P
Toplam	43(100)	26(60)	17 (40)	
Yaş				
< 50	13(30)	6(46)	7(54)	AD
> 50	30(70)	20(67)	10(23)	
Cinsiyet				
Erkek	28(65)	17(60.7)	11(39.3)	AD
Kadın	15(35)	9(60)	6(40)	
Tümör Lokalizasyonu				
Fundus-Korpus	20(46.5)	12(60)	8(40)	AD
Antrum	22(51)	14(63.6)	8(36.4)	
Linitis Plastica	1(2.5)			
Tümör Çapı				
< 5	16(39.2)	7(43.8)	9(56.2)	AD
> 5	27(60.8)	19(70.4)	8(29.6)	
Makroskopik Tip (Borrmann)				
Polipoid-Fungatif(Tip-I)	19(44)	9(47.4)	10(52.6)	AD
Ülseratif-Diffüz inf.(Tip III-IV)	24(56)	17(70.8)	7(29.2)	
Mikroskopik Tip				
Papiller	6(14)	6(100)	0(0)	
Tübüler	16(37.2)	11(68.7)	5(31.3)	AD
Az diferansiye	12(27.9)	4(33.3)	8(66.7)	
Müsinöz	4(9.3)	2(50)	2(50)	
Taşlı Yüzük Hücreli	5(11.6)	3(60)	2(40)	
Lauren Sınıflaması				
İntestinal	19(44.2)	15(79)	4(21)	0.019
Diffüz infiltran	19(44.2)	7(36.8)	12(63.2)	
Mikst	5(11.6)	4(80)	1(20)	
Diferansiyasyon				
İyi Diferansiye	26(60.4)	19(73)	7(27)	0.038
Az diferansiye	17(39.6)	7(41)	10(59)	
Tümörün İnvazyon Derinliği				
T3	31(72)	21(67.7)	10(32)	AD
T4	12(28)	5(41.6)	7(58.4)	
Lenf Gangliyonu Tutulumu				
N0	10(23.3)	8(80)	2(20)	AD
N1-N2	33(76.7)	18(54.5)	15(45.5)	
Uzak Metastaz				
M0	34(79)	22(64.7)	12(35.3)	AD
M1	9(21)	4(44.4)	5(55.6)	
TNM Evresi				
IIA	9(20.9)	8(89)	1(11)	
IIIA	15(34.9)	9(60)	6(40)	AD
IIIB	10(23.3)	5(50)	5(50)	
IV	9(20.9)	4(50)	4(50)	
Lenfatik Damar İnvazyonu				
Negatif	2(4.6)	1(50)	1(50)	AD
Pozitif	41(95.4)	25(61)	16(39)	
Venöz Damar İnvazyonu				
Negatif	23(53.4)	15(65.2)	8(34.8)	AD
Pozitif	20(46.6)	11(55)	9(45)	
Proliferasyon İndeksi				
Düşük (<67)	16(37.2)	13(81.2)	3(18.8)	0.032
Yüksek (>67)	27(62.8)	13(48)	14(52)	
P53				
Negatif	22(51.2)	13(59)	9(41)	AD
Pozitif	21(48.8)	13(62)	8(38)	

Aİ: Anjiogenez İndeksi

AD:Anlamli değil

bir örnek doku tüm tümörün özelliğini de yansıtabilir. Genelde geniş bir doku kesitinde bu incelemeleri mümkün kılan rezeksiyon materyallerinde antijen ekspresyonundaki heterojenite sınırlı bir problem potansiyeline sahiptir. Tümöre ait birden fazla parafin blok kesitine immunhistokimya uygulayarak daha sağlıklı sonuçlara ulaşılabilir. Bazı araştırmalarda kullanılan küçük biyopsi materyallerinde immunhistokimyasal incelemelerin (14,24) gerçekleri yansıtabilmesi için endoskopik inceleme sırasında işlemi uygulayan kişinin tümörün farklı bölgelerinden alacağı çok sayıdaki biyopsi materyaline uygulanması gerekir.

Sonuç olarak, evre IV gastrik karsinomlarda p53 immunreaktivitesinin ve yüksek PCNA indeksinin daha sık olduğu saptanmıştır. Bunun yanısıra, p53 immunreaktivitesi gösteren tümörlerin daha hızlı proliferasyon gösterdiği görülmüştür. Ayrıca, endoluminal bir komponent içermeyen Borrmann tip III ve tip IV tümörlerin (ülseratif ve diffüz infiltratif), lumen içine doğru büyüme eğilimi gösteren Borrmann tip I ve tip II tümörlerden (polipoid ve fungatif) daha yüksek bir PCNA indeksine sahip olduğu gösterilmiştir. Tümörlerin mikrodamar yoğunluğu, PCNA indeksine paralel olarak artmaktadır. Mikrodamar yoğunluğunun, az diferansiye tümörlerde, iyi-orta derecede diferansiye tümörlerden daha fazla olduğu gözlenirken, makroskopik özellikler ve evre ile aralarında ilişki saptanmamıştır.

Çalışmamızda gözlediğimiz bulgular ile PCNA indeksi ve p53 immunreaktivitesinin tümör evresini, özellikle de uzak metastaz potansiyelini yansıttığı sonucuna varılmıştır. Yeterli tümör dokusu içeren endoskopik biyopsi materyallerinde elde edilen immunhistokimya bulgularının, tümör rezeksiyon materyallerindeki bulgular ile paralellik gösterip göstermediği araştırılmalıdır. Aynı paralellüğün endoskopik biyopsi materyallerinde de saptanması durumunda, bu markerların operasyon öncesi tümör evresini saptamada yardımcı olabileceği düşünülebilir. Bütün bu bulgular ışığında, preoperatif evrelemenin bir komponenti olarak, bu biyolojik parametrelerin saptanması, hastaların gerek prognozunu, gerekse tedavi seçeneklerinin (neoadjuvan kemoterapi ya da primer cerrahi) daha isabetli olarak değerlendirilmesine katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

1. Ashley SW, Evoy D, Daly JM. Stomach. In: Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC, Daly JM, Fischer JE, Galloway AC, eds: Principles of Surgery. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 1999. P.1201-1206.
2. Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni Jr JF: Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. JAMA 1991; 265:1287-1289.
3. Roder JD, Böttcher K, Siewert JR, Busch R, Hermanek P, Meyer H: The German Gastric Carcinoma Study Group. Prognostic factors in gastric carcinoma. Cancer 1993; 72:2089-2097.
4. Antonioli DA: Precursors of gastric carcinoma: A critical review with a brief description of early gastric cancer. Hum Pathol 1994; 25:994-1005.
5. Nakamura K, Ueyama T, Yao T, Xuan ZX, Ambe K, Adachi Y, Yakeishi Y, Matsukuma A, Enjoji M: Pathology and prognosis of gastric carcinoma. Cancer 1992; 70:1030-1037.
6. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Shimomatsuya T: Association of tumour vasculature with tumour progression and overall survival of patients with non-early gastric carcinomas. Br J Cancer 1997; 75:566-571.
7. Allgayer H, Heiss MM, Schildberg FW: Prognostic factors in gastric cancer. Br J Surg 1998; 85:1651-1664.
8. Marubni E, Bonfanti G, Bozetti F, Boracchi P, Amadori D, Folli S: A prognostic score for patients resected for gastric cancer. Eur J Cancer 1993; 29A:845-850.
9. Steele RJC, Thompson AM, Hall PA, Lane DP: The p53 tumour suppressor gene. Br J Surg 1998; 85:1460-1467.
10. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL: Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. Lancet 1990; 335:675-679.
11. Battifora H: p53 immunohistochemistry: A word of caution. Hum Pathol 1994; 25:435-437.
12. Brito MJ, Williams GT, Thompson H, Filipe MJ: Expression of p53 in early (T1) gastric carcinoma and precancerous adjacent mucosa. Gut 1994; 35:1697-1700.
13. Ojima H, Maehara Y, Ohno S, Sakaguchi Y, Ichiyoshi Y, Sugimachi K: Growth pattern and p53 overexpression in patients with early gastric cancer. Cancer (Suppl) 1995; 75:1454-1459.
14. Matturi L, Biondo B, Cazzullo A, Colombo B, Giordano F, Guarino M, Pallotti F, Turconi P, Lavezzi AM: Prognostic significance of different biological markers (DNA indeks, apoptosis, p53, karyotype) in 126 adenocarcinoma gastric biopsies. Anticancer Res 1998; 18:2819-2826.
15. Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CCW, Kelloff DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett 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 deregulation.

- lated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990; 162:285-294.
16. Weidner N: Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: The evidence continues to grow. *J Pathol* 1998; 184:119-122.
 17. Ming S: Adenocarcinoma and other malignant epithelial tumors of the stomach. In: Ming S, Goldman H, eds. *Pathology of the gastrointestinal tract*. Philadelphia: W.B.Saunders Company; 1992. p. 584-617.
 18. Lechago J, Genta RM: Stomach and duodenum. In: Damjanov I, Linder J, eds. *Anderson's Pathology*. 10th ed. St. Louis, Missouri: Mosby; 1996. p.1661-1707.
 19. Rosai J: Gastrointestinal tract. In: Rosai J, ed. *Ackerman's Surgical Pathology*. 8th ed. St. Louis, Missouri: Mosby-Year Book Inc; 1996. p. 616-666.
 20. Yokozaki H, Kuniyasu H, Semba S, Yasui W, Tahara T: Molecular bases of human stomach carcinogenesis. In: Tahara E, ed. *Molecular pathology of the gastroenterological cancer: Application to clinical practice*. Tokyo: Springer-Verlag; 1997. p. 55-70
 21. Levine AJ, Momand J, Finlay CA: The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351:453-456.
 22. Kern SE: p53: Tumour suppression through control of the cell cycle. *Gastroenterol* 1994; 106:1708-1711.
 23. Ioachim E, Goussia D, Stefanou D, Jagnantis N: Expression of p53 protein in gastric cancer: An immunohistochemical study with correlation to proliferative activity. *Anticancer Res* 1997; 17:513-517.
 24. Yonemura Y, Kimura H, Fushida S, Tugawa K, Nakai Y, Kaji M, Fonseca L, Yamaguchi A, Miyazaki I: Analysis of proliferative activity using anti-proliferating cell nuclear antigen antibody in gastric cancer tissue specimens obtained by endoscopic biopsy. *Cancer* 1993; 71:2448-2453.
 25. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J: Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143:401-409
 26. Horak ER, Leek R, Klenk N, Lejeune K, Stuart N, Greenall M, Stepniowska K, Harris AL: Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340:1120-1124.
 27. Maeda K, Chung Y, Takatsuka S, Ogawa Y, Sawada T, Yamashita Y, Onoda N, Kato Y, Nitta A, Arimoto Y, Kondo Y, Sowa M: Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1995; 13:477-481.
 28. Vartanian RK, Weidner N: Endothelial cell proliferation in prostatic carcinoma and prostatic hyperplasia: Correlation with Gleason's score, microvessel density and epithelial cell proliferation. *Lab Invest* 1995; 73:844-850.
 29. Brawer MK, Deering RE, Brown M, Preston SD, Bigler SA: Predictors of pathologic stage in prostatic carcinoma. *Cancer* 1994; 73:678-687.
 30. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Lu C, Kitaoka A, Matsuyama K, Muraoka R: Tumour angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 1997; 57:1043-1046.
 31. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J: Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Eng J Med* 1991; 324:1-8.
 32. Brooks PC: Cell adhesion molecules in angiogenesis. *Cancer Met Rev* 1996; 15:187-194.
 33. Folkman J: Tumor angiogenesis. In: Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA, eds. *The molecular basis of cancer*. Philadelphia: W.B.Saunders Company; 1995. P. 206-232.
 34. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG: Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64:327-336.
 35. Kyokane K, Ito M, Sato Y, Ina K, Ando T, Kusugami K: Expression of bcl-2 and p53 correlates with the morphology of gastric neoplasia. *J Pathol* 1998; 184:382-389.
 36. Reed JC: Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; 124:1-6.
 37. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, Vogelstein B: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989; 342:705-708.

YAZIŞMA ADRESİ:

Dr.Ferhunde DİZDAROĞLU

Dr.Mine G.GÜLLÜOĞLU

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi
patoloji ABD, Millet cad. 34390
Topkapı, İSTANBUL