

PROSTAT KANSERLİ HASTALARIN KAN DOLAŞIMINDAKİ PROSTAT KANSER HÜCRELERİNDE RT-PCR YÖNTEMİ İLE PSA VE PSMA DÜZEYLERİ

PSA AND PSMA LEVELS OF CIRCULATING CELLS ASSESSED BY REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR) IN PROSTATE CANCER

Şahin KABAY, Ahmet Hamdi TEFEKLİ, Ömer SARILAR, Murat BİNBAŞ, Ömer FIRAT, Ahmet Yaser MÜSLÜMANOĞLU

Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Üroloji Kliniği, İSTANBUL

ABSTRACT

Introduction: Currently reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for prostate specific antigen (PSA) and prostate specific membrane antigen (PSMA) messenger RNA are being evaluated for detecting circulating prostate cells. The aim of the study is to detect PSA and PSMA levels in patients with prostate cancer by nested RT-PCR and evaluate their association with clinic patient characteristics.

Materials and Methods: A total of 36 men diagnosed to have prostate cancer were enrolled to the study before initiation of any treatment and assessed by digital rectal examination, serum PSA (immunoassay), fPSA/PSA ratio, transrectal ultrasonography guided biopsy and by bone scan and abdominal CT when indicated. During transrectal ultrasonography, biopsy was made in 21 patients with pathological findings in rectal examination and 15 patients with high serum PSA levels. Control group consisted of 10 women and 5 men with BPH. A 5-10 ml. peripheral blood specimen was obtained from all patients. PSA and PSMA mRNA levels of circulating cells were assessed by nested RT-PCR in all cases and results were compared with serum PSA, clinical stage, Gleason score and presence of lymph node or distant organ metastasis.

Results: The mean age and serum PSA levels of men with prostate cancer were 69.3±4.5 (62-80) years and 101.5± 406.6 (3.79-2464) ng/ml, median 24.87 ng/ml, respectively. Clinical staging revealed on T2 disease in 10 (27.7%), T3 disease in 10 (27.7%) and T4 disease in 16 (44.4%) cases. Radiological evaluation documented lymph node involvement in 20 (55.5%) and distant organ metastasis in (8.3%) cases. RT-PCR PSA levels were positive in 15 (41.6%) and PSMA levels were positive in 21 (58.3%) patients. RT-PCR positive PSA and PSMA by RT-PCR resulted positive in a higher percent of cases with distant organ metastasis (p<0.05). Positive PSA and PSMA levels by RT-PCR were observed in a higher percent of patients in clinical stage 4 when compared to stage 2 and 3 disease. Patients with lymph node involvement exhibited higher PSA and PSMA RT-PCR (p<0.05). RT-PCR results did not reveal any significant correlation with serum PSA, fPSA/tPSA and Gleason score. In control group RT-PCR revealed negative results in all. Of 15 patients with positive RT-PCR PSA levels, 13 had (86.6%) lymph node metastasis, 12 had (80%) distant metastasis. Of 21 patients with positive RT-PCR PSMA levels, 15 (71.4%) had lymph node metastasis and 14 (66.6%) had distant metastasis.

Conclusion: PSA and PSMA can be detected in a significant percent of prostate cancer patient with lymph node involvement and distant organ metastasis by RT-PCR. Our preliminary results indicate this method can be efficiently used in the diagnosis of advanced disease and their follow up. Further research is necessary using a much larger number of patients with a longer follow up.

Key words: Prostate Cancer, Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, Prostate Specific Membrane Antigen

ÖZET

Günümüzde "Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction" (RT-PCR) yöntemi ile dolaşımdaki prostat kanser hücrelerindeki Prostat Spesifik Antijen ve Prostat Spesifik Membran Antijeni (PSMA)'nin mRNA'ları saptanabilmektedir. Bu çalışmada prostat kanserli hastalarda nested RT-PCR ile bakılan PSA ve PSMA düzeylerinin evrelendirme ve olguların özelliklerine göre değişimi incelendi.

Kliniğimizde prostat kanseri tanısı alan 36 olgu tedaviye başlamadan önce parmakla rektal muayene, serum PSA (immunoassay), sPSA/tPSA oranı, transrektal ultrasonografi ve biyopsi, gerektiğinde kemik sintigrafisi ve abdominal BT ile değerlendirildi. Hastaların 21'ne rektal muayenede patolojik bulgu, 15'e ise serum PSA yüksekliği

nedeniyle transrektal ultrasonografi (TRUSG) eşliğinde biyopsi yapıldı. Kontrol grubu olarak 15 olgu (10 kadın, 5 BPH hastası) çalışma kapsamına alındı. Bu yöntem için tüm hastalardan 5-10 cc venöz kan alındı. Tüm olgularda Nested RT-PCR yöntemiyle dolaşımdaki hücrelerdeki PSA ve PSMA mRNA düzeyleri incelendi. Elde edilen sonuçlar hastaların PSA, klinik evre, Gleason skoru, lenf nodu tutulumu ve metastaz durumuna göre değerlendirildi.

Çalışmaya alınan prostat kanserli olguların ortalama yaşı 69.3±4,5 (62-80) yıl, ortalama PSA 101.5±406.6 (3.79-2464) ng/ml, medyan 24.87 ng/ml idi. Klinik olarak olguların 10'u (%27.7) T2, 10'u (%27.7) T3, 16'sı (%44.4) T4 evresindeydi. Radyolojik olarak 20 (%55.5) olgu da lenf nodu 3 (%8.3) olguda uzak metastaz tespit edildi. Çalışmaya alınan olguların serumları RT-PCR ile incelendiğinde toplam 15 (%41.6) hastada RT-PCR PSA antijeninin pozitif olduğu, 21 (%58.3) hastada RT-PCR PSMA antijeninin pozitif olduğu saptandı. Evre 4'deki RT-PCR PSA ve PSMA pozitifliği evre 2 ve 3 göre anlamlı olarak yüksek olduğu ve bu pozitifliğin evre arttıkça yükseldiği tespit edildi. Lenf nodu pozitif ve uzak metastazı olan hastalarda RT-PCR PSA ve PSMA düzeyleri anlamlı olarak pozitif bulundu ($p<0.05$). RT-PCR sonuçlarıyla, serum PSA, sPSA/tPSA ve Gleason skoru arasında istatistiksel ilişki saptanmadı. Kontrol grubu olarak alınan 15 olgunun hepsinde hem RT-PCR PSA hem de RT-PCR PSMA düzeyleri negatif bulundu. RT-PCR PSA pozitif olan 15 hastanın 13'ünde (%86.6) lenf nodu metastazı olduğu, 12 (%80) hastada ise uzak metastaz olduğu saptandı. Benzer şekilde RT-PCR PSMA pozitif olan 21 hastanın 15'de (%71.4) lenf nodu metastazı olduğu, 14 (%66.6) hastada ise uzak metastaz olduğu gözlemlendi.

RT-PCR yöntemiyle ileri evredeki lenf nodu ve uzak metastazı olan hastalarda yüksek oranda dolaşımdaki hücrelerde PSA ve PSMA mRNA'sı tespit edilebilmektedir. Bulgularımız özellikle ileri hastaların tanısında ve tedavilerinin takibinde bu yöntemin etkili olabileceğini düşündürmektedir ancak bu konuda uzun dönem takipli çok sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Prostat Kanseri, Reverse Transkriptaz Polimerize Zincir Reaksiyonu, Prostat Spesifik Membran Antijen

GİRİŞ

Prostat kanseri erkeklerde en sık tanı konulan tümördür¹. Son yıllarda serum prostat spesifik antijen (PSA), parmakla prostat inceleme (PRİ) ve transrektal ultrasonografi (TRUS) yardımıyla küratif tedavi şansı olan organa sınırlı kanserlerin tanısı artmaktadır. Uzun dönem takiplerde organa sınırlı prostat kanserinde radikal tedavi sonrası hastalıksız yaşama olasılığının arttığı bildirilmektedir². Ancak günümüzde kullanılan tarama yöntemleri organa sınırlı olan ve olmayan hastalığı ayırt etmekte yetersiz kalabilmektedir.

Yeni tanı konulan olguların %60'ı serum PSA ve PRİ ile evrelendirildiğinde organa sınırlı kabul edilip radikal küratif tedavi alabilmektedir. Ancak yalnız PSA ile saptanarak rektal incelemede ele gelmeyen tümörlerde dahi %40 oranında patolojik olarak organ sınırını aşmış tümör tespit edilmektedir³. Bu nedenle erken dönemde yayılımın saptanabilmesi ve bu sayede tedavi alternatiflerinin uygun düzenlenmesi amacıyla farklı evreleme teknikleri üzerinde çalışılmaktadır.

Son moleküler biyolojik çalışmalar prostat kanserli hastalarda kemik iliği ve kanda prostat hücrelerini gösterebilmektedir. "Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction" (RT-PCR) yöntemi ile dolaşımdaki prostat kanser hücrele-

rendeki PSA ve Prostat Spesifik Membran Antijeni (PSMA)'nin mRNA'ları saptanabilmekte ve mikroskopik uzak organ yayılımı öngörülebilmektedir⁴.

Bu çalışmanın amacı; prostat kanserli hastalarının serumundaki hücrelerde RT-PCR yöntemi ile elde edilen PSA ve PSMA sonuçlarını hastaların klinik evreleri ile karşılaştırmak, uzak metastaz ve lenf bezi tutulumunu hangi düzeyde belirleyebileceğini incelemektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ocak 2002 ile Şubat 2003 tarihleri arasında kliniğimize başvuran ve daha önce tedavi olmamış prostat kanseri tanısı konulan 36 erkek hasta çalışma kapsamına alındı. Tüm hastalar ayrıntılı anamnez ve fizik muayene ile değerlendirildi.

Hastaların 21'ine rektal muayenede patolojik bulgu, 15'e ise serum PSA yüksekliği nedeniyle transrektal ultrasonografi (TRUS) eşliğinde biyopsi yapıldı. Tüm olgulara 6+2 gerektiğinde 8+2 kadran biyopsi uygulandı ve elde edilen parçalar tek bir patolog tarafından değerlendirildi. Serum PSA düzeyi 10 ng/ml üzerindeki olgulara kemik sintigrafisi, 20 ng/ml üzerindeki olgulara abdomino-pelvik tomografi (BT) yapıldı. Kemik sintigrafisinin şüpheli olduğu durumlarda doğrulama için manyetik rezonans görüntüleme (MRG) yöntemi kullanıldı. Tüm olgular akciğer

grafisi ile değerlendirildi. Klinik evreleme 1997 yılı TNM sınıflandırmasını, patolojik sınıflandırma ise Gleason skorlama sistemine göre yapıldı. Kontrol grubu olarak 5 sağlıklı erkek, 5 kadın ve 5 BPH hastası alındı. Hiçbir hastaya tetkik öncesi hormonal tedavi, radyoterapi veya cerrahi tedavi uygulanmadı.

Çalışmaya alınan tüm olguların serumlarında RT-PCR yöntemiyle PSA, PSMA mRNA düzeyleri bakıldı. Bu yöntem için tüm hastalardan 5-10 cc venöz kan alındı ve RT-PCR tekniğinin işlem aşamaları sırayla yapıldı; Aşama 1'de ficoll gradyenti ile mononükleer hücrelerin izolasyonu, Aşama 2'de total RNA ekstraksiyonu, Aşama 3'de cDNA sentezi, Aşama 4'de Nested PCR işlemi yapıldı. Nested PCR c-DNA'nın iki farklı primer çiftiyle çoğaltılması işlemidir. PSA ve PSMA amplifikasyonu için aşağıdaki primer baz çiftleri kullanıldı.

PSA iç bölge primerleri: 486 bp (base-pair)'lik PCR ürünü verir.

PSA-494 5'- TAC CCA CTG CAT CAG GAA CA -3'

PSA-960 5'- CCT TGA AGC ACA CCA TTA CA -3'

PSA dış bölge primerleri: 355 bp (base-pair)'lik PCR ürünü verir.

PSA-559 5'- ACA CAG GCC AGG TAT TTC AG -3'

PSA-894 5'- GTC CAG CGT CCA GCA CAC AG-3'

PSMA iç bölge primerleri: 647 bp (base-pair)'lik PCR ürünü verir.

PSMA-1368 5'- CAG ATA TGT CAT TCT GGG AGG TC-3'

PSMA-2015 5'- AAC ACC ATC CCT CCT CGA ACC-3'

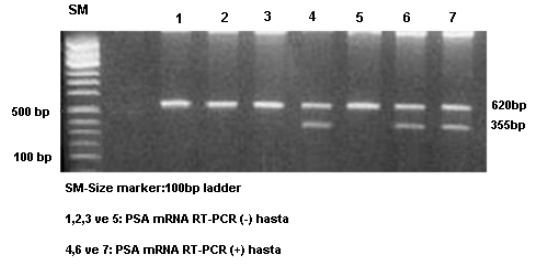
PSMA dış bölge primerleri: 234 bp (base-pair)'lik ürünü verir.

PSMA-1689 5'- CCT AAC AAA AGA GCT GAA AAG CCC-3'

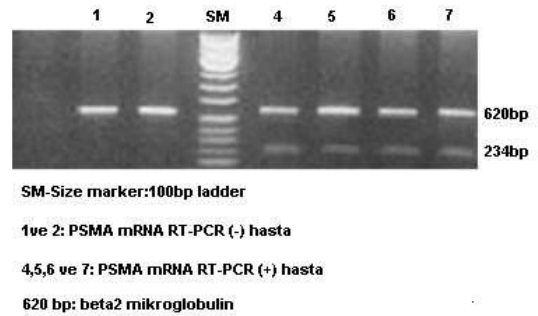
PSMA-1923 5'- ACT GTG ATA CAG TGG ATA GCC GCT-3' dir.

Son Aşama'da ise PCR ürünlerinin değerlendirilmesinde PCR ürünleri etidyum bromide

ile boyandı ve %2'lik agaroz jelde yürütülerek UV altında değerlendirildi (Şekil 1-2).



Şekil 1. PSA mRNA RT-PCR sonuçlarının etidyum bromid ile boyanmış olan agaroz-jel fotoğrafları



Şekil 2. PSMA mRNA RT-PCR sonuçlarının etidyum bromid ile boyanmış agaroz-jel fotoğrafları

RNA ekstraksiyonunun internal kontrolü için $\beta 2$ mikroglobulin genine ait primer dizileri kullanıldı. Bu primerler ekson 2 ve ekson 4'ten seçildi. Elde edilen PCR ürünü 620 bp uzunluğunda idi. $\beta 2$ mikroglobulin PCR negatif çıkan olgular noninformatif olarak kabul edildi ve çalışma kapsamına alınmadı. Bu primer diziler;

$\beta 2$ (Ekson2) 5'- AGCAGA GAA TGG AAA GTC AAA -3'

$\beta 2$ (Ekson4) 5'- TGT TGA TGT TGG ATA AGA GAA- 3'

RT-PCR yöntemiyle elde edilen sonuçlar pozitif ve negatif olarak bildirildi ve bulgular hastaların evresi, serum PSA düzeyi, serbest/total PSA oranı, Gleason skoru, lenf nodu metastazı, uzak metastaza göre ayrıldı ve karşılaştırıldı.

BULGULAR

Bu çalışmaya alınan 36 prostat kanseri olgusunun klinik evreleri T2aNoMo ve T4bN3M1c arasında değişmekteydi. Hastaların yaşları 62 ile 80 arasında olup, ortalama 69.38 ± 4.51 'di.

Hastaların ortalama serum PSA değeri 101.50±406.65 ng/ml, medyan 24.87 ng/ml idi ve 3.79 ile 2464.20 ng/ml arasında değişmekteydi. Hastalar klinik olarak evrelendirildiğinde 10 (%27.7) hastanın T2, 10 (%27.7) hastanın T3, 16 (%44.4) hastanın T4 evresinde olduğu saptandı.

Sintigrafik değerlendirmede 16 hastada kemik metastazı saptandı. Yapılan radyografik incelemelerde 20 hastada patolojik lenf nodu gözlenirken 3 olguda uzak organ metastazı gözlemlendi. Sonuç olarak bu radyolojik ve klinik bulgular göz önüne alındığında, TNM sınıflamasına göre 10 hastanın evre 2'de, 6 hastanın evre 3'de, 20 hastanın evre 4'de olduğu belirlendi.

Bu evrelendirmeye göre evre 2'de bulunan 10 hastanın 9'na radikal prostatektomi, 1 hastaya radikal radyoterapi uygulandı. Evre 3'de bulunan 6 hastanın 3'üne hormonal tedavi+radyoterapi, 3 hastaya TUR-P+ hormonal tedavi yapıldı. Evre 4'de bulunan 20 hastanın 10'na hormonal tedavi, 4'üne iki taraflı orşiektomi, 6'sına TUR-P + hormonal tedavi uygulandı.

Çalışmaya alınan olguların serumları RT-PCR ile incelendiğinde toplam 15 (%41.6) hastada RT-PCR PSA antijeninin pozitif olduğu, 21 (%58.3) hastada RT-PCR PSMA antijeninin pozitif olduğu saptandı.

RT-PCR PSA sonuçları olguların özelliklerine göre incelendiğinde PSA değerleri 0-10 ng/ml ve 10 ng/ml'den büyük ve s/tPSA oranı %15'den küçük ve %15'den büyük alındığında RT-PCR PSA antijeni pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (p=0.15, p=0.19). Gleason skor 7'den küçük, 7 ve büyük hastaların RT-PCR PSA pozitiflikleri istatistiksel olarak anlamlı ifade etmekteydi (p=0.047). Benzer şekilde lenf nodu metastazı (p=0.0016) ve uzak

metastaz (p=0.0037) pozitifliği açısından da istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

Klinik evrelemeye göre, evre 4'deki pozitiflik oranları evre 2 ve 3, evre 2'deki pozitiflik oranları evre 3 ve 4'le karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı biçimde farklı oldukları belirlendi (p=0.017, p=0.0016)

RT-PCR PSMA sonuçları olguların özelliklerine göre incelendiğinde ise PSA değeri 0-10 ng/ml ve 10 ng/ml'den büyük ve s/tPSA oranı %15'den küçük ve %15'den büyük alındığında RT-PCR PSMA antijeni pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı fark ifade etmiyordu (p=0.065, p=0.06). Gleason skor 7'den küçük, 7 ve büyük hastalarda RT-PCR PSMA pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0.21). Lenf nodu pozitifliği (p=0.022) ve uzak metastaz açısından RT-PCR PSMA pozitifliği değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p=0.0016).

Klinik evrelemeye göre incelendiğinde, evre 4'deki pozitiflik oranları evre 2 ve 3'le karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı biçimde farklı olduğu belirlendi (p=0.0038). Buna karşılık evre 2'deki pozitiflik oranları evre 3 ve 4'le karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir farklılık göstermediği saptandı (p=0.11).

Sonuçlar bir başka yönden incelendiğinde RT-PCR PSA pozitif olan 15 hastanın 13'ünde (%86.6) lenf nodu metastazı olduğu, 12 (%80) hastada ise uzak metastaz olduğu saptandı. Benzer şekilde RT-PCR PSMA pozitif olan 21 hastanın 15'de (%71.4) lenf nodu metastazı olduğu, 14 (%66.6) hastada ise uzak metastaz olduğu gözlemlendi.

Çalışmada RT-PCR yöntemi ile PSA ve PSMA bakılan kontrol hastalarının tümü negatif sonuçlandı. RT-PCR PSA ve PSMA'nın hastalık tanısındaki, lenf nodu ve uzak metastazdaki sensitivite ve spesifiteleri tablo 1'de gösterilmiştir.

	RT-PCR PSA	RT-PCR PSMA	RT-PCR PSA Lenf Nodu Metastazı	RT-PCR PSA Uzak Metastaz	RT-PCR PSMA Lenf Nodu Metastazı	RT-PCR PSMA Uzak Metastaz
Duyarlılık	%50	%58.3	%65	%75	%75	%87.5
Özgüllük	%100	%100	%87.5	%85	%62.5	%65
Pozitif Prediktif Değer	%100	%100	%87	%80	%71	%67
Negatif Prediktif Değer	%41	%50	%67	%81	%67	%87

Tablo 1. RT-PCR PSA ve PSMA'nın hastalık tanısındaki, lenf nodu ve uzak metastazdaki duyarlılık ve özgüllük

TARTIŞMA

Prostat kanseri erkeklerde en sık görülen solid tümör olup kansere bağlı ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırayı almaktadır⁵.

Prostat kanserinde kapsül dışına yayılımın olup olmaması tedavi seçimini etkileyen en önemli faktördür. Tümör periprostatik dokuya ilerlemiş ise cerrahi tedavi ile lokal kür sağlanma oranı oldukça düşüktür ve nüks gelişebilmektedir. Partin ve arkadaşları radikal prostatektomi yapılan 955 hastanın yapılan takiplerinde nüks gelişen hastaların %58'inde sadece serum PSA değerinin yükseldiğini bildirmektedir⁶. Radikal prostatektomi sonrası gelişen nüks, yetersiz tümör rezeksiyonuna veya klinik olarak tespit edilemeyen mikrometastazlara bağlı gelişebilir⁷. Klinik olarak tespit edilemeyen mikrometastatik odaklara bağlı sistemik hastalık haline gelmiş prostat kanserlerinde lokal tedavi ile kür sağlamak imkansızdır^{6,8}. Dolayısıyla prostat kanserinin organa sınırlı olup olmadığından radikal tedavi öncesi doğru olarak tespiti hastalığın tedavisinin planlanmasında önemli bir faktördür.

Klasik prognostik faktörler olan prostat biyopsisindeki tümör volümü, histolojik grade (Gleason skor), perinöral invazyon, veziküla seminalis tutulumu, klinik evre, serum PSA değeri ve görüntüleme yöntemlerinin (TRUS, BT, MRG) değerleri sınırlıdır. Klinik olarak organa sınırlı (T2) prostat kanserlerinin histopatolojik değerlendirilmesinde bunların sadece %52'si organa sınırlı olarak tespit edilirken, %31'inde kapsül tutulumu (pT3a), geri kalan %17'de ise ya veziküla seminalis tutulumu yada lenf nodu tutulumu tespit edilebilmektedir. BT ve MRG tümörün tümörün lokal yayılımı ve lenf metastazı açısından düşük sensitivite nedeniyle rutin olarak kullanılmamaktadır. Lenf nodu tutulumu açısından pelvik görüntüleme yüksek riskli hastalara yapılmaktadır (serum PSA>20 ng/ml, PR1'de lokal ileri evre palpasyon bulgusu, TRUS eşliğinde biyopside kötü diferansiyasyon tespiti). Bu durum araştırmacıları klinik olarak tespit edilemeyen mikro-metastazları ortaya çıkarabilmek için yeni yöntemler üzerinde çalışmaya zorlamaktadır. Bunlardan biri de RT-PCR yöntemi ile dolaşımdaki prostat hücrelerinin tespitidir. RT-PCR ilk olarak 1988'de Kronik Myeloid lösemi (KML)

hücreleri tarafından üretilen Bcr/Abl mRNA'ların saptanmasında kullanılmıştır^{9,10}.

Esas olarak mikrometastatik hastalığın saptanmasında kullanılan RT-PCR için hücre tarafından üretilen tanımlanabilen özgül mRNA ve metastatik hücreler bulundurabilen, örnekleme için kolay elde edilebilen bir doku kaynağı gereklidir. Prostat kanseri bu kriterlere uymaktadır.

Klinik olarak mRNA kullanımının potansiyel bir dezavantajı PSA ekspresyonunun hormonal olarak regüle olmasıdır. Hormon tedavisi alan hastalar düşük seviyelerde PSA mRNA eksprese edebilir. Bu da dolaşımdaki prostat hücrelerinin saptanmasının olasılığını azaltır¹¹.

PSMA metastatik hastalığı olanlarda prostat kanserinde artan ekspresyonu gösteren bir membran glikoproteinidir¹². Buna karşın PSMA mRNA yalancı pozitif sonuçlarının karaciğer, akciğer ve normal periferik kan gibi diğer dokulardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir¹³. PSMA ekspresyonunun hormonal tedaviden etkilenmediği düşünülmekte ve radikal prostatektomi sonrası hormonal tedavi alan hastalarda dolaşımdaki prostat hücrelerinin saptanmasında bir avantaj olarak belirmektedir¹⁴.

Genel olarak, bilinen metastatik hastalıklı olguların %39- 100'de periferik kanda dolaşımdaki prostat kanser hücrelerinin saptanması prostat spesifik mRNA dizinleri RT-PCR yöntemi ile gösterilebilmektedir^{4,15-19}. Çalışmaların çoğunda kontrol örnekleri negatiftir. Katz ve arkadaşları moleküler evrelemede RT-PCR kullanmış ve testin kapsüler penetrasyon, pozitif cerrahi sınır ve seminal vezikül tutulumu ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir²⁰. Aynı grup tarafından yapılan başka bir çalışmada ameliyat öncesi PSA seviyelerine dayanarak hastaların patolojik evrelerini tahmin etmede PSA RT-PCR'ı kullanmış ve serum PSA seviyeleri 10 ng/ml'nin üzerinde ve evre pT3 olanlarda RT-PCR sonuçları %91 pozitif bulunmuştur²¹. RT-PCR tekniği kullanılarak PSA ve PSMA bilinen kemik metastazı olan olgular da incelendiğinde %100 oranında pozitif sonuç alınabilmektedir. Ayrıca RT-PCR pT3 hastalığı olanların %81.5'inde pozitif bulunurken, pT1-T2 evre hastalığı olan olgularda %37.5 oranında pozitif bulunmaktadır¹⁹. Bizim çalışmamızda prostat kanserli olguların serumları RT-PCR ile incelendiğinde toplam 15 (%41.6) hastada PSA'-

nın pozitif olduğu, 21 (%58.3) hastada PSMA'nın pozitif olduğu saptandı. Yayınlarda bu oranlar RT-PCR PSA için %0-72, RT-PCR PSMA için %16-81 oranında değişmektedir. Yüksek olarak bulduğumuz bu değerler, çalışmamıza büyük oranda lenf nodu tutulumu ve metastatik hastalıklı olguların alınmasıyla açıklanabilir. RT-PCR PSA antijeni pozitifliği lenf nodu metastazı ($p=0.0016$) ve uzak metastaz ($p=0.0037$) açısından istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Dolayısıyla RT-PCR ile PSA ve PSMA tayininin metastatik hastaların büyük kısmında pozitif olduğu tespit edildi.

Klinik evrelemeye göre incelendiğinde evre 4'deki pozitiflik oranları evre 2 ve 3 ile evre 2'deki pozitiflik oranları evre 3 ve 4'le karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı biçimde farklı olduğu saptandı ($p=0.0016$, $p=0.017$). Sonuç olarak olgu sayısı sınırlı olmasına karşın RT-PCR ile PSA sonuçlarının evre ile yakın ilişkisi olduğu belirlendi. Yapılan çalışmalarda patolojik evrenin de RT-PCR ile uyumlu olduğu görülmektedir.

RT-PCR yöntemi ile PSMA sonuçlarımız klinik evrelemeye evre 4'deki pozitiflik oranları evre 2 ve 3'le karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı biçimde farklı olduğu belirlendi ($p=0.0038$). Buna karşılık evre 2'deki pozitiflik oranları evre 3 ve 4'le karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir farklılık göstermediği saptandı ($p=0.11$). Bu bulgu özellikle metastatik hastalıkta RT-PCR PSMA sonuçlarının yüksek oranda pozitif olmasıyla desteklenmektedir. Lenf nodu pozitifliği ve uzak metastaz açısından RT-PCR PSMA pozitifliği değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.022$, $p=0.0016$).

Bulgularımız, RT-PCR ile PSA tayininin RT-PCR PSMA'ya göre daha değerli olduğunu göstermekle beraber, çalışmaya aldığımız olguların sayısının az olması istatistiksel verilerde farklı sonuçların alınmasına neden olabilmektedir. Ayrıca kliniğimizin referans merkezi olması sebebiyle çok sayıda metastatik prostat kanserli hasta çalışma kapsamına alındı. Buna karşılık ön bulgularımız, bu yöntemin prostat kanserini evrelendirme ve tedavinin planlanmasında önemli bir yer alabileceğini öngörmektedir. Özellikle komorbiditesi olan, sınırdaki yaş grubunda ve muayene

nede ileri evre bulgusu veren olguların değerlendirilmesi ve gerçek evreye göre tedavi verilmesinde bu yöntem umut vermektedir.

Hem lokalize hem ekstrakapsüler hastalığı olanların belli bir yüzdesinde dolaşan prostat hücrelerinin saptanması konusundaki sonuçlar merkezler arası değişebilmektedir. Moleküler evreleme üzerindeki metaanalizler RT-PCR sonuçları üzerindeki farklılıkları etkileyen parametreler üzerinde tartışılmaktadır²². Spesifik faktörlerden bazıları hastalardan multipl örnekleme yerine tek örnekleme hazırlama, işlem teknikleri, standart RT-PCR tetkikleri yerine nested ve örneklenen materyal (kemik iliği yerine kan) gibi konularını içermektedir^{14,17,23}. Bundan da anlaşılabilirliği gibi örnek toplama ve işlem gibi birçok problem RT-PCR'ın prostat kanserinin evrelemesinde kullanılmadan önce aydınlatılmalıdır.

SONUÇ

PSA ve PSMA mRNA dizinlerinin RT-PCR ile çoğaltılması periferik kanda dolaşan prostat hücrelerinin saptanmasında oldukça başarılıdır. Çalışmamızda RT-PCR PSA sonuçları olguların özelliklerine göre incelendiğinde, bulgular ileri evredeki hastalarda RT-PCR ile hem PSA hem de PSMA pozitifliği anlamlı derecede yüksekti. Ayrıca gerek uzak metastazı olan gerekse lenf nodu pozitif olan hastaların RT-PCR sonuçları istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olarak belirlendi. Buna karşılık serum PSA değerlerinin ve Gleason skorunun RT-PCR sonuçları ile istatistiksel bir ilgisi olmadığı saptandı. Bununla birlikte, yöntemde kullanılan işlemler oldukça duyarlıdır. Teknik güçlükler merkezler arası protokollerin standardizasyonu ve işlem detaylarının gözden geçirilmesi ile üstesinden gelinebilir.

KAYNAKLAR

- 1- **Parker SL, Tong T, Bolden SL, et al:** Cancer statistics. *Cancer J Clin*, 47: 5, 1997.
- 2- **Boring CC, Squires TS, Tong T:** Cancer statistics. *Cancer J Clin*, 43: 7, 1993.
- 3- **Partin AW, Kattan MW, Subong EN, et al:** Combination of prostate-specific antigen, clinical stage and gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. *JAMA*, 9:278, 1997.
- 4- **Corey E, Arfman EW, Oswin MM, et al:** Detection of circulating prostate cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction of human

- glandular kallikrein (hK2) and prostate-specific antigen messages. *Urol*, 50: 184-188, 1997.
- 5- **Wingo PA, Tong T, Bolden S:** Cancer statistics, *Cancer J Clin*, 45: 8, 1995.
 - 6- **Partin AW, Pound CR, Clemens JQ, et al:** Serum PSA after anatomic radical prostatectomy: The John Hopkins experience after 10 years. *Urol Clin North Am*, 20: 713, 1993.
 - 7- **Byar DP, Mostofi FK:** Veterans Administrative Cooperative Urologic Research Groups: Carcinoma of prostate: Prognostic evaluation of certain pathologic features in 208 radical prostatectomies. *Cancer*, 30: 5, 1972.
 - 8- **Trapasso JG, deKarnion JB, Smith RB, et al:** The incidence and significance of detectable levels of serum prostate-specific antigen after radical prostatectomy. *J Urol*, 152: 1821, 1994.
 - 9- **Kawasaki ES, Clark SS, Coyne MY, et al:** Diagnosis of chorionic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 5698, 1988.
 - 10- **Roth MS, Antin JH, Ash R, et al:** Prognostic significance of Philadelphia chromosome-positive cells detected by the polymerase chain reaction after allogenic bone marrow transplant for chorionic myelogenous leukemia. *Blood*, 79: 276, 1992.
 - 11- **Qlu SD, Young CY, Bilhartz DL, et al:** In situ hybridization of prostate-specific antigen mRNA in human prostate. *J Urol* 144: 1550, 1998.
 - 12- **Israeli RS, Powell CT, Fair WR, et al:** Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res*, 53: 227, 1993.
 - 13- **Renneberg H, Friedetzky A, Konrad L, et al:** Prostate-specific membrane antigen is expressed in various human tissues: Implication for the use of PSM reverse transcriptase polymerase chain reaction to detect hematogenous prostate cancer spread. *Urol Res* 27: 23, 1999.
 - 14- **Israeli RS, Miller WH, Jr. Su SL, et al:** Sensitive nested reverse transcriptase polymerase chain reaction detection of circulating prostate tumor cells: Comparison of prostate-specific membrane antigen and prostate-specific antigen based assays. *Cancer Res* 54: 6306, 1994.
 - 15- **Sokoloff MH, Tso CL, Kaboo R, et al:** Quantitative polymerase chain reaction does not improve preoperative prostate cancer staging: A clinicopathological molecular analysis of 121 patients. *J Urol* 156: 1560, 1996.
 - 16- **Ignatoff JM, Oefelein MG, Watkin W, et al:** Prostate-specific antigen reverse transcriptase polymerase chain reaction assay in preoperative staging of prostate cancer. *J Urol*, 158: 1870, 1997.
 - 17- **Ellis WJ, Vessella RL, Corey E, et al:** The value of an antigen reverse transcriptase polymerase chain reaction assay in preoperative staging and follow-up of patients with prostate cancer. *J Urol* 159: 1134, 1998.
 - 18- **de la Taille A, Olsson CA, Buttyan R, et al:** Blood based reverse transcriptase polymerase chain reaction assays for prostate-specific antigen: Long term follow-up confirms the potential utility of this assay in identifying patients more likely to have biochemical recurrence following radical prostatectomy. *Int J Cancer*, 84: 360, 1999.
 - 19- **Grasso YZ, Gupta MK, Levin HS, et al:** Combined nested RT-PCR assay for prostate-specific antigen and prostate-specific membrane antigen in prostatic cancer patients: Correlation with pathological stage. *Cancer Res*, 58: 1456, 1998.
 - 20- **Katz AE, Olsson CA, Raffo AJ, et al:** Molecular staging of prostate cancer with the use of an enhanced reverse-transcriptase PCR assay. *Urology*, 43: 765, 1995.
 - 21- **Nejat RJ, Katz AE, Olsson CA:** The role of reverse transcriptase polymerase chain reaction for staging patients with clinically localized prostate cancer. *Semin Urol Oncol*, 16: 40, 1998.
 - 22- **Gregorakis AK, Holmes EH, Murphy GP:** Prostate-specific membrane antigen: Current and future utility. *Semin Urol Oncol*, 16: 2, 1998.
 - 23- **Wood DP, Jr Banerjee M:** Presence of circulating prostate cells in the bone marrow of patients undergoing radical prostatectomy is predictive of disease-free survival. *J Clin Oncol*, 15: 3451, 1997.