

PROSTAT ADENOKARSİNOMUNDA VE BENİGN PROSTAT HİPERPLAZİSİNDE, HÜCRE PROLİFERASYONUNUN BELİRLENMESİNDE, PROLİFERATING CELL NUCLEAR ANTİGEN (PCNA) DEĞİŞİK EVRE VE DERECELENDİRMEDEKİ SONUÇLARIN KARŞILAŞTIRILMASI

PCNA; FOR DETERMINATION OF CELL PROLIFERATION IN PROSTATE ADENOCARCINOMA AND BENIGN PROSTATE HYPERPLASIA: COMPARING THE RESULTS IN DIFFERENT STAGES AND GRADES

BAYKAL, M.,* ÇULHA, M.,* DEMİRBAĞ, N.,** MUTLU, N.,* MERDER, E.,* CANBAZOĞLU, N.*

ÖZET

İmmünohistolojik çalışmalar, tümörlü dokunun biyolojik aktivitesinin araştırılmasında, bazı avantajlarından dolayı, günümüzde sık olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda, çoğalan hücre çekirdekleri anti-PCNA antikoru ile işaretlenip, hücre çoğalma hızı araştırıldı. 4 Benign prostat hiperplazili ve 10 prostat adenokarsinomlu olgunun doku örnekleri incelendi. Her olguda anti-PCNA ile boyanan hücrelerin boyanmamışlarına oranına PCNA işaretleme indeksi adı verildi. PCNA işaretleme indeksinin, tümörlü dokuda, benign prostat hiperplazisinden çok daha yüksek olduğu bulundu. PCNA işaretleme indeksinin, Gleason skoru ve evre ile doğru orantılı olduğu fakat evreleme ile bağlantısının daha zayıf olduğu hesaplandı.

Tümör aktivitesinin belirlenmesinin öneminin gün geçtikçe anlaşıldığı günümüzde, elde ettiğimiz ilk sonuçlar doğrultusunda, diğer parametrelerle uyumlu olan ve güvenli sonuçlar verebilen PCNA işaretlenmesinin faydalı bir gösterge olacağını düşünmekteyiz.

ABSTRACT

Nowadays according to some advantages, immunohistological studies are frequently used for researching biological activation of tumors. In our study, cell proliferation rate was investigated by labeling to nucleus of actually dividing cells, with PCNA. Antibody specimens of 4 benign hyperplasia and 10 prostatic adenocarcinoma were examined. The PCNA labeling index was determined by counting the number of PCNA labeled cells in tissue sections. PCNA labeling index was found in positive correlation with stage and Gleason score but its relation with stage was not strong. According to our preliminary results, in determination of tumor activity, the importance of which was seen day by day, we thought that, PCNA labeling was a useful assay with its reliable results and accomodation with other parameters.

ANAHTAR KELİMELEER: Prostat, PCNA, Gleason, evre.

KEY WORDS: Prostate, PCNA, Gleason, stage

* Haseki Hastanesi Üroloji Kliniği

** Haseki Hastanesi Patoloji Kliniği

GİRİŞ

Tümör dokusunda hücre çoğalma hızının belirlenmesi için yapılan ilk çalışmalarda mitotik indeks ölçümünden yararlanılmıştır.¹ Hatta diğer dokulara ve çevreye verdiği zararlar bilindiği halde radyoaktif maddeler de bu amaç için kullanılmıştır.² Sonraları hücre çoğalmasının immunohistolojik çalışmalar ile değerlendirilmesinin bazı avantajlar sayılacağı düşünülmüştür. Bunlar arasında hücre ve doku yapısının korunması, sonuçların çok çabuk ve basit olarak alınması ve radyoaktif madde kullanılmaması sayılabilir.^{3,4} Hücre çoğalmasının ölçümünde, Bromdeoxyurine karşı oluşan monoklonal antikörlerin kullanılması bu konuda bir çığır açmıştır.²

Aktif olarak çoğalan hücreler belirli bazı proteinler üretirler. Bu proteinlerin antijenik özelliğinden hücre proliferasyonunun immunolojik araştırmasında yararlanır. PCNA, 36.000 moleküler ağırlıklı bir nükleer proteindir.⁵ Bu protein Bravo ve Celis tarafında yapılan hücre çoğalması ile ilgili iki boyutlu, elektroforetik çalışmalarda gözlenmiştir. PCNA'nın hücre siklusu ile çok yakın bağlantılı olduğu görülmüştür.⁶ DNA sentezi başlamadan önce, G1 de yüksek PCNA seviyeleri görülür ve S fazında maksimuma ulaşır. G2 ve M fazlarında ise azalır.⁷ Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda PCNA'nın hücre çoğalmasının başlanmasında etkin ve yardımcı bir rolü olduğu da gösterilmiştir.⁸ İmmunofloresan çalışmalarda bir çok dokuda hücrelerin anti-PCNA ile boyandığı gösterilmiştir fakat hepatosit ve renal tubulus hücreleri gibi çoğalmayan hücrelerde bu boyanma görülmemiştir.^{6,9} Normal bir dokuda PCNA ile boyanan hücreler görüldüğünde bu dokunun çoğalan hücreler içerdiği düşünülmelidir. Genellikle dalak, timusun korteksi, testis, bağırsağın epitelyal hücreleri ve cildin bazal hücrelerinde böyle bir çoğalma sıklıkla görülür.¹⁰

Çalışmamızda, benign prostat hiperplazisi olan hastalarda ve adenokarsinomlu hastalardan alınan biopsi ve operasyon piyeslerinde çoğalan hücreleri göstermek istedik. Benign prostat hiperplazili hastalarda belli seviyede hücre çoğalmasının var olduğunu düşünmekteyiz. Buna karşın bir prostat adenokarsinomunda hücre çoğalma hızının ne kadar farklı olduğunu araştırdık. Her iki grup hastalardan alınan çok sayıda preparatta anti-PCNA ile boyanan hücreleri saptayıp oranları hesapladık.

Prostat adenokarsinomlu hastalarda PCNA işaretleme indeksi ile Gleason skoru arasındaki ilişkiyi araştırdık. Değişik evrelerdeki hastalarda PCNA işaretleme indeksinin ne şekilde değiştiğini de inceledik.

HASTALAR VE YÖNTEM

10 prostat adenokarsinomlu ve 4 benign prostat hiperplazili hastanın doku örnekleri incelenmiştir. Benign prostat hiperplazi hastaların preparatları, ikisi açık operasyon piyesinden ve diğer ikisi de TUR materyalinden hazırlanmıştır. Prostat adenokarsinomlu olguların tamamı TUR materyali örnekleri kullanılmıştır. Olgular 59-82 yaş aralığında ve ortalama yaş 69.7'dir.

Tüm olgulara, fizik muayeneyi takiben, transrektal ultrasonografi, serum prostatik asid fosfat, prostat spesifik antijeni, total asid fosfat, alkali fosfat, sedimantasyon, hemogram, formül lökosit seviyeleri tespiti, Ürografi ve ayrıca prostat adenokarsinomu teşisiyle takip edilen olgulara kemik sintigrafisi ve CAT yapılmıştır.

Elde edilen dokular formaldehit ile fikse edilip parafine gömüldükten sonra anti-PCNA monoklonal antikoru PC10 ile streptavidin-biotin AP tekniği uygulanarak hücre nüvelerinde PCNA varlığı araştırıldı.

Kesitler ortalama 5 mikron kalınlığında hazırlanarak bir gece 58°C etüve bekletildi. Her vaktan bir kesit de negatif kontrol amacıyla kullanıldı. Deparafinizasyondan sonra primer antikor ile oda sıcaklığında 2 saat enkübe edildi. Yıkama solüsyonu olarak TRIS buffer kullanıldı. Biotinleşmiş antimouse immunoglobulin antikoru ve streptavidin ile konjuge edilmiş AP solüsyonu ile yirmişer dakika inkübe edildikten sonra kromojen Fast Red ile Ag-Ab kompleksi boyandı. Mayer's Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

Her olguda, özellikle adenokarsinomlu hastalarda tümörün beş değişik yerinden, beş immersiyo objektif alanı incelendi. Her alanda tüm hücreler sayılarak kaç hücre nüvesinin immun boyanma gösterdiği bulundu ve her vaka için ortalama boyanma oranı saptandı. Hafif ya da koyu boyanmış olmasına bakılmaksızın immun boyanma gösteren tüm hücreler değerlendirilmeye alındı.

Tümör derecelendirimleri aynı patolog tarafından Gleason sistemine göre yapılmıştır. Ayrıca bütün olguların evrelemesi tamamlanmış ve teda-

vileri planlanmıştır.

Anti-PCNA antikorı ile boyanan hücrelerin boyanmamışlara oranına PCNA işaretleme indeksi adı verilip tüm olgularda bu oranlar hesaplanmıştır.

PCNA işaretleme indeksinin, benign prostat hiperplazi ve adenokarsinomlu olgulardaki seviyeleri karşılaştırılmıştır. PCNA işaretleme indeksi ile Gleason skoru ve Evre ile ilişkisi ayrıca araştırılmıştır.

BULGULAR

Bening prostat hiperplazi olgularında PCNA işaretleme indeksi 0-1.02 aralığında ve ortalaması 0.345'dir. Bu olgularda PSA seviyeleri normal olup patolojik incelemede şüpheli alan görülmemiştir.

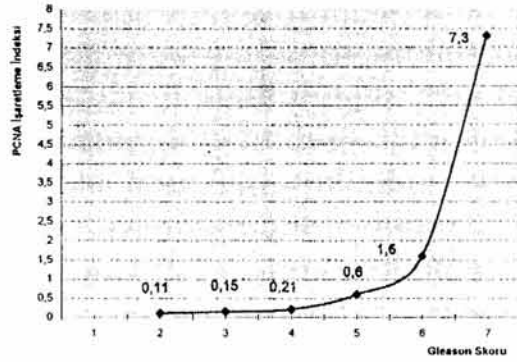
Prostat adenokarsinomlu olgularda PCNA işaretleme indeksi 0-13.8 aralığında ve ortalaması 2.069'dur. PCNA işaretleme indeksi her iki grup olgu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur ($\chi=0,05$, "t" testi). Prostat adenokarsinomlu olgularda anti-PCNA ile boyanan hücre nüveleri Resim-1' de gösterilmiştir. Bu hücrelerin diğerlerinden ayırımı kolayca yapılabilmektedir.

Resim 1: Prostat adenokarsinomlu olgularda anti-PCNA ile boyanan hücre nüveleri

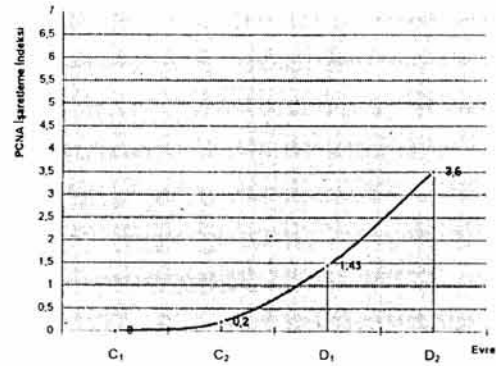


PCNA işaretleme indeksi ve Gleason skoru arasındaki ilişki grafik olarak verilmiş ve (Grafik-I) istatistiksel olarak bu iki değişken arasında pozitif yönde orta derecede bir bağıntı saptanmıştır ($r=0.57$).

PCNA işaretleme indeksi ve Evre arasındaki ilişkide grafik olarak verilmiş ve (Grafik-II) istatistiksel olarak bu iki değişken arasında pozitif yönde fakat zayıf bir bağıntı hesaplanmıştır ($r=0.358$).



Grafik 1: PCNA işaretleme indeksi ve Gleason skoru arasındaki ilişki



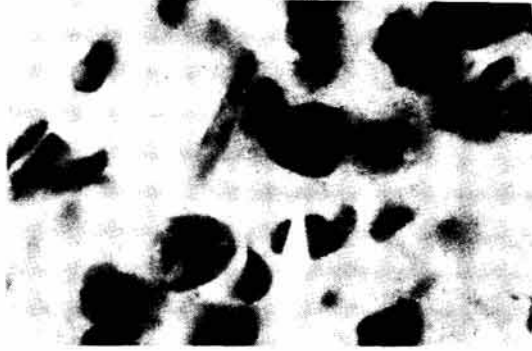
Grafik 2: PCNA işaretleme indeksi ve Evre arasındaki ilişki

Not: PCNA işaretleme indekslerinin Gleason skoru ve Evreye isabet eden ortalamaları alınmıştır.

TARTIŞMA

Tümör hücrelerinin çoğalma potansiyellerinin belirlenmesi tümörün biyolojik aktivitesi hakkında hekimleri yönlendirmektedir.¹¹ Bu nedenle, tümörlü dokuda, hücre bölünme hızının tespiti için günümüzde farklı bir kaç yöntem kullanılmaktadır. DNA flow sitometri de bu yöntemlerden biridir. Flow sitometrik incelemede değişik DNA içeriği olan hücrelerin sayılması sonucunda, tümör aktivitesi hakkında bilgi sahibi olunup tedavi şekmi oluşturulur.¹² Yaptığımız çalışmada sonuçlarımızı, flow sitometri ile kıyaslamadık. Fakat bazı çalışmalarda DNA flow sitometri sonuçları ile PCNA işaretleme indeksi arasında hücre kinetiği ölçümlerinde belirgin bir fark görülmemiştir. Ancak flow sitometri için alınan doku örneklerinin

Resim 2: Prostat adenokarsinomunda ve benign prostat hiperplasisinde hücre : **Resim 3:** Proliferasyonun belirlenmesinde PCNA: Değişik evre ve derecelendirmedeki sonuçların karşılaştırılması.



hatalı oluşundan dolayı bazen farklı sonuçlar bildirilmiştir.¹³ Buna karşı anti-PCNA antikoruna ile boyamada dokunun yapısı bozulmadan çoğalan hücreler rahatlıkla gözlemlenebilir. Hatta çoğalan hücreleri saptayabilen bir diğer hücre spesifik monoklonal antikor aynı anda kullanılarak çift kör bir çalışma da yapılabilir. Bu da immunospesifik boyama tekniğinin başka bir avantajıdır.¹ Çalışmamızda, anti-PCNA ile işaretlenmiş tümör hücrelerini rahatlıkla gözlemledik ve çoğalan hücreleri boyayabilen başka ilave bir teknik kullanmadık. Literatürde çoğalan hücreleri işaretleyebilen çok sayıda nükleer protein tarif edilmiştir. Bu proteinler arasında Ki-67, C5F10 ve Bromdeoxyuridine sayılabilir. Bunlar bölünmeyen hücrelerde bulunmazlar.

İmmunospesifik boyama ile yapılan birçok çalışmada, boyanan hücre odacıkları, boya tutmayan diğer hücre grupları ile çevrili olarak bulunurlar.¹ Çalışmamızda da olguların çoğunda bu şekilde dizimler tespit edildi. Sonuçta, prostat adenokarsinomunda, hücrelerin hepsinin topyekün değil de sadece belli oranlar dahilinde çoğaldıkları düşünülmüştür. Bu keyfiyetin sebebi de tam olarak açıklanamamaktadır.¹

İyi differansiye prostat adenokarsinomu salığı guddeleri oluşturmaya meyillidir. Orta differansiye olanda gudde yapısı bozulmaya başlar. Az differansiye prostat adenokarsinomunda ise gudde yapıları ortadan kalkar. Bu durum Gleason skorlaması ile rakamsal olarak ifade edilmektedir.¹⁴ Çalışmamızda Gleason skoru ve PCNA işaretleme indeksi arasında aynı yönde ve orta derecede anlamlı bir bağlantı saptanmıştır. Hücre kinetiğinin ölçümü için timidin işaretleme indeksi kullanılarak yapılan bir çalışmada, Gleason skoru ve timi-

din işaretleme indeksi arasında da pozitif bir korelasyon olduğu bildirilmiştir.¹¹ Çalışmamızda PCNA işaretleme indeksi ve evreleme arasında, yine aynı yönde hareket eden fakat zayıf bir bağlantı bulunmuştur. Örneğin D₂ evresindeki 5 hastamızda PCNA işaretleme indeksleri 0.11-13.8 arasındaydı. Her evredeki hastada çok farklı PCNA işaretleme indekslerine rastlanabileceği Nemato ve ark. yaptığı çalışmada da gösterilmiştir.¹ Ancak gene de ileri evrelerde daha yüksek oranda, yüksek PCNA işaretleme indekslerine rastlayacağımızı düşünmekteyiz.

Her olgu için ayrı bir Gleason skoru verilebileceği halde, tümörler değişik histopatolojik yapıda bölgeler içerebilirler. Bu da tümörün kesin histopatolojik durumunun tespitini zorlaştırır. Aynı durum PCNA işaretleme indeksini de etkiler. Değişik bölgelerde değişik PCNA işaretleme indeksleri ile karşılaşılabilir.¹ Çalışmamızda, tümörün çeşitli yerlerinden alınan örneklerde değişik PCNA işaretleme indeksleri hesapladığımızda bunların ortalamasını çalışmamıza yansıtık. Tümör prognozunun daha iyi anlaşılabilmesi için, tümörlü dokudan alınan örnek sayısının artırılmasının önemi böylece anlaşılabilir.

Anti-PCNA ile boyamada, işaretlenen hücre nüvelerinin pozitif veya negatif olarak değerlendirilebilmesi önemlidir. Çoğu zaman bu hesaplamalar kolayca yapılabilir.¹⁵ Ancak bazı çalışmalarda bir takım hücreler çekirdekteki boyayı çok düşük yoğunlukta tuttıkları görülmüştür. G1 ve G3 fazındaki hücrelerde bu zayıf boyanma izlenmiştir. Bu zayıf boyanan hücreler Celis ve ark. çalışmasında negatif olarak kabul edilmiştir.⁷ Çalışmamızda zayıf boyanan hücreler de değerlendirilmeye alındı. Bölünme aşamasında S fazından sonra

PCNA seviyesinin çok düşük olduğu Takasaki ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir.⁹ Biz de bu zayıf boyanan hücreleri bölünme aşamasında kabul edip değerlendirmeye aldık.

Çalışmamızda, benign prostat hiperplazisinde PCNA işaretleme indeksi ortalama 0.345 olarak bulundu. Adenokarsinomda ise bu oran 2.069 idi. Dernier ve arkadaşları, timidin işaretleme indeksini benign prostat hiperplazisinde 0.11 ve az differansiyel adenokarsinomda da 4.3 olarak hesaplamışlardır.¹⁶ Her iki çalışmada da değerler arasında istatistiksel anlamlılık görülmüştür.

Bu çalışmada, çoğalan tümör hücre çekirdekleri anti-PCNA antikoları ile işaretlenerek hücre proliferasyonu rakamsal olarak ifade edilmeye çalışıldı. Tümörlü dokudan elde edilen veriler benign dokudakinden çok daha yüksek bulundu ve bu sonuçların Gleason skoru ile uyumluluğu görüldü. Aynı evrede farklı Gleason skorları olabileceği gibi farklı PCNA işaretleme indekslerine de rastlanıldı. Yine de evreleme ve PCNA işaretleme indeksi arasındaki pozitif bağlantı gösterildi.

Çalışmamız az vaka ile sınırlı olduğundan özellikle tümörlü olgularda değişik evre ve derecelendirmedeki değerlendirmemiz yeterli olamayabilir. Vaka sayısının artırılmasıyla daha kesin sonuçlar alınabilecektir.

Hücre çoğalması, tümör aktivitesi ve hastalığın prognozu arasındaki ilişki bilinerek, PCNA işaretleme indeksinin, uygulama zorluklarına rağmen, hekimler için oldukça faydalı bir gösterge olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- 1) Ryasuke, N., Hideki, K., Miyakawa, I., Uchida, K., et al.: Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) Cyclin in human prostate adenocarcinoma. *J. Urol.* 149, 165-169, 1993.
- 2) Gratzner, H. G.: Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-

iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA. *Science*: 218-474, 1982.

- 3) Holl, P.A., Levison, D.A.: Assessment of cell proliferation in histological material. *J. Clin. Pathol.* 43: 184-92, 1990.
- 4) Holl, P.A., Woods, A.L.: Immunohistological markers of cell proliferation. Achievements, problems and prospects. *Cell Tiss Kinetics.* 23: 531-49, 1990.
- 5) Mathews, M.B., Bernstei, R.M., Franza, B.R. and Gargels, J.L.: Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 33:374, 1984.
- 6) Miyachi, K., Fritzier, M.S. and Tan, E.G.: Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunology* 121:2228, 1978.
- 7) Celis, J.E. and Celis, A.: Cell cycle dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells. Subdivision of S phase. *Proct. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 3262, 1985.
- 8) Bravo, R., Frank, R., Blundell, P.A. and Mc. Donald-Bravolt, H.: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase alpha. *Nature* 326-515, 1987.
- 9) Takasaki, Y., Deng, S.S., Tan, E.M.: A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation: Its distribution in synchronize cells. *J. exp. Med.* 154: 1899-901, 1981.
- 10) Bruce, A., Robins, M.D., Daniel delu Vega; Ogata, K.: Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid Human Malignancies; *Arch. Pathol. Lab. Med.*: 111; 841, 1987.
- 11) Meyer, J.S., Sufrin, G. and Martin, S.A.: Proliferative activity of benign human prostate, prostate adenocarcinoma and seminal vesicle evaluated by thymidine labeling. *J. Urol.* 128: 1353, 1982.
- 12) Ritchie, A.W.S., Dorey, F., Layfield, L., Hannon, J., Lourekovich, H.: Lovrekovich: Relationship of DNA content to conventional prognostic-factors in clinically localised adenocarcinoma of the prostate. *British. J. Urol.* 62:254-60, 1988.
- 13) Rocholle, L., Cacia, Moro, D., Coltera and Allen, M. Grown: Rapid immunatin analysis of proliferative grade using Anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies infixed Embedded Tissues: *Americ. J. of Pathol.* 134: 733-1989.
- 14) Emil, A., Tonaglis, Jack W., Mac. Aninch.: Smith's General Urology Prentice Hall International p. 334, 1992.
- 15) Loyd, R.V., Wilson, B.S., Vurani, J. et al.: Immunocytochemical characterization of a monoclonal antibody that recognizes mitosing cells. *Am. J. Pathol.* 121: 275-283, 1985.
- 16) Derner, G.B.: Basal cell proliferation in benign prostatic hyperplasia. *Cancer* 41:1857, 1978.