

Müsinöz Over Tümörlerinde p53, bcl-2, nm23 Ekspresyonu ile Bu Ekspresyonun Klinik ve Histopatolojik Parametrelerle İlişkisi

p53, bcl-2, nm 23 Expression in Mucinous Ovarian Tumors and Relationship of This Expression with Histopathological Parameters

Dr. Deniz ARIK^a
Dr. Sezer KULAÇOĞLU^b

^aPatoloji Kliniği,
Karaman Devlet Hastanesi, Karaman
^bPatoloji Kliniği,
Ankara Numune Eğitim ve
Araştırma Hastanesi, Ankara

Geliş Tarihi/Received: 26.05.2010
Kabul Tarihi/Accepted: 09.06.2011

*Bu çalışma, 18. Ulusal Patoloji Kongresi
(25-29 Ekim 2008, Antalya)'nde
poster bildiri olarak sunulmuştur.*

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. Deniz ARIK
Karaman Devlet Hastanesi,
Patoloji Kliniği, Karaman
TÜRKİYE/ TURKEY
denarik@hotmail.com

ÖZET Amaç: Çalışmamızda müsinöz over tümörlerinde immünohistokimyasal olarak p53, bcl-2 ve nm23 ekspresyonun araştırılması ve benign, borderline ve malign tümörler arasında ekspresyonun farklı olup olmadığının saptanması amaçlandı. Malign tümörlerde evre, yaş, tümör boyutu, omentum tutulumu, periton sıvısında malign hücre varlığı ve bazı histopatolojik parametreler (derece, mitoz sayısı, nükleer pleomorfizm, büyüme paterni) ile p53, bcl-2 ve nm23 ekspresyonlarının ilişkisinin belirlenmesi hedeflendi. **Gereç ve Yöntemler:** Çalışmaya Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümünde tanı alan 47 müsinöz over tümörü alındı. Tümörler malign, borderline ve benign olarak gruplandı. Morfolojiyi en iyi yansıtan parafin blokta immünohistokimyasal olarak p53, bcl-2 ve nm23 çalışıldı. Tümör hücrelerinde %1'den fazla boyanma pozitif kabul edildi. Boyanma %1-10 arasında ise (+), %11-50 arasında ise (++) , %50'den fazla ise (+++) olarak skorlandı. **Bulgular:** Benign tümörlerde p53 ekspresyonu bulunmadığı, borderline tümörlerde p53'ün %9.1, müsinöz karsinomlarda ise %7.7 pozitif olduğu belirlendi. Bcl-2 ekspresyonu ise benign, borderline ve malign tümörlerde sırasıyla %39.1, %36.4 ve %30.8 idi. nm23, benign tümörlerde %52.2, borderline tümörlerde %81.8 ve karsinomlarda %84.6 eksprese oluyordu. **Sonuç:** p53'ün müsinöz tümörlerin patogeneze veya karsinogenezinde rolü olmayabileceği düşünülmüştür. Bcl-2'nin müsinöz over tümörlerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede farkı bulunamamıştır. İleri evre ve yüksek dereceli tümörlerde nm23'ün daha fazla eksprese olması nm23'ün over karsinomlarında bir onkogen gibi davrandığı fikrini desteklemektedir. Müsinöz karsinomlarda p53, nm23, bcl-2 ekspresyonu olan ve olmayan gruplarda yaş, tümör boyutu, bilateralite, omentum tutulumu, periton sıvısında malign hücre varlığı ve histopatolojik parametreler (tümör büyüme paterni, pleomorfizm, mitoz sayısı) açısından anlamlı fark saptanamamıştır.

Anahtar Kelimeler: Over tümörleri; p53 proteini (325-355), insan; bcl2-related protein a1; nm23 nükleozid difosfat kinazlar

ABSTRACT Objective: In our study we aimed to immunohistochemically investigate p53, bcl-2 and nm23 expressions in mucinous ovarian tumors and to detect whether there was a difference among benign, borderline and malignant tumors in terms of expression. It was aimed to determine the relationship between stage, age, tumor size, omentum involvement, presence of malignant cells in peritoneal fluid and some histopathological parameters (grade, mitotic count, nuclear pleomorphism, growth pattern) in malignant tumors and p53, bcl-2 and nm23 expressions. **Material and Methods:** A total of 47 mucinous ovarian tumor cases that were diagnosed in Pathology Department of Ankara Numune Research and Training Hospital were enrolled in the study. Tumors were grouped as malignant, borderline and benign. P53, bcl-2 and nm23 were studied immunohistochemically in the paraffin block reflecting the morphology best. Staining more than 1% was accepted as positive. If staining was 1-10%, it was scored as (+), 11-50%, it was scored as (++) and if more than 50%, it was scored as (+++). **Results:** p53 expression was detected to be absent in benign tumors, as 9.1% in borderline tumors and 7.7% positive in mucinous carcinomas. Bcl-2 expression was found as 39.1%, 36.4% and 30.8% respectively in benign, borderline and malignant tumors. nm23 was expressed as 52.2% in benign tumors, 81.8% in borderline tumors and 84.6% in carcinomas. **Conclusion:** p53 was seen not to have a role in pathogenesis or carcinogenesis of mucinous tumors. A statistically significant difference was not found in bcl-2 expression of mucinous ovarian tumors. Higher expression of the nm23 in advanced stage and high grade carcinomas suggests that nm23 acts as oncogene in these tumors. In mucinous carcinomas, a significant difference was not found between groups with or without p53, nm23, bcl-2 expression in terms of age, tumor size, bilaterality, omentum involvement, presence of malignant cells in peritoneal fluid and histopathological parameters (growth pattern, pleomorphism, mitotic count).

Key Words: Ovarian neoplasms; p53 protein (325-355), human; bcl2-related protein a1; nm23 nucleoside diphosphate kinases

doi:10.5336/medsci.2010-19266

Copyright © 2011 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011;31(5):1057-64

Over karsinomları, jinekolojik maligniteler arasında en çok ölüme neden olan tümörlerdir ve müsinöz karsinomlar epitelyal over tümörlerinin %10'unu oluşturur.¹ Bu tümörler de benign (müsinöz kistadenom), borderline ve malign (müsinöz kistadenokarsinom) olarak gruplandırılır.² Makroskopik olarak seröz tümörlere göre daha büyük, kısmen veya tamamen kistik, çoğunlukla da multiloküledir. Mikroskopik olarak malign müsinöz tümörlerde, hücresel atipi ve sıralanma artışı, gland ve papillalarda daha kompleks yapı (tomurcuklanma, köprüleşme, solid odaklar) ve stromal invazyon alanları izlenir.² Gland yapıları ve stroma arasındaki ilişkinin karmaşık olduğu olgularda stromal invazyonun değerlendirilmesindeki zorluk nedeniyle malign ve borderline müsinöz tümörleri birbirinden ayırmak kolay olmayabilir. Bu ayırmda kullanılabilir bazı kriterler önerilmiştir. Buna göre invazyon kesin ise tümör malign olarak kabul edilmelidir. İnvazyonun kesin olmadığı durumlarda epitelin kalınlığı dört hücre sırasından az ise borderline tümör, dört veya daha fazla ise karsinom olarak adlandırılmalıdır.²

p53, oluşan DNA hasarına verilen yanıtta, hücre siklusunda kontrol noktasında görevlidir. Tümör supresör gen olmasının yanı sıra p53 farklı genlerde transkripsiyonu aktive eden multifonksiyonel proteinler kodlar. Bu genler hücre siklus arresti veya DNA tamir genleri ve apoptozisi düzenleyen genlerdir. İnsanlarda görülen tümörlerin yaklaşık yarısında p53, mutasyon ile inaktive olmuş şekilde bulunur.³ Aktive p53'ün kaybı veya fonksiyonunu kaybetmesi hücrenin genetik hasarı ile birlikte kontrolsüz replikasyonuna neden olabilir.³

Epitelyal over tümörlerinde değişen oranlarda p53 ekspresyonu rapor edilmiştir. Over karsinomlarında p53 ekspresyonu ile ilgili çalışmaların derlendiği bir makalede histolojik tipe göre en düşük p53 ekspresyonunun ortalama %29 ile müsinöz karsinomlarda olduğu belirtilmektedir. Borderline müsinöz tümörlerde ise bu ekspresyon ortalama %11'dir. Benign tümörlerde %7 p53 ekspresyonu vardır.⁴

Bcl-2 geni 18. kromozomda yerleşen bir proto-onkogendir. Bcl-2 geni, programlı hücre ölümünde (apoptozis) önemli rol oynar. Literatürde over karsinomlarında %19-33 arasında değişen bcl-2 ekspresyonları mevcuttur.^{5,6} Bir çalışmada normal over dokusunda saptanan güçlü epitelyal bcl-2 boyanmasının benign, borderline ve malign epitelyal over tümörlerine doğru gidildikçe azaldığı bildirilmiş, malign olgularda yüksek bcl-2 ekspresyonunun artmış sağ kalım ile korele olduğunu belirtilmiştir.⁶

nm23, ilk kez 1988 yılında nükleotid difosfat (NDP) kinaz proteinini kodlayan, metastaz baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır. İn vitro şartlarda nm23 ile muamele edilen tümör hücrelerinin migrasyon yapma özelliğinin, dolayısıyla metastaz kabiliyetinin azaldığı bildirilmiştir.⁷ Over karsinomunda, benign ve borderline over tümörlerine ve normal over dokusuna göre daha yüksek nm23 ekspresyonunun bulunduğu rapor edilmiştir.⁸ Lenf nodu metastazı olan olgularda da, olmayanlara göre nm23 ekspresyonunun daha düşük olduğu bulunmuştur.⁹

Çalışmamızda overin müsinöz tümörlerinde immünohistokimyasal olarak p53, bcl-2 ve nm23 ekspresyonunun araştırılmasına ve benign, borderline ve malign tümörler arasında ekspresyonun farklı olup olmadığının saptanmasına çalışıldı. Malign tümörlerde evre, yaş, tümör boyutu, omentum tutulumu, periton sıvısında malign hücre varlığı gibi özellikler ve bazı histopatolojik parametreler (derece, mitoz sayısı, nükleer pleomorfizm, yapısal patern) ile p53, bcl-2 ve nm23 ekspresyonlarının ilişkisinin belirlenmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümünde tanı alan 47 müsinöz over tümörü dahil edildi. Tümörler malign, borderline ve benign olarak gruplandı. Karsinom olguları evre, yaş, tümör boyutu, tümör evresi, derece, histopatolojik özellikler (yapısal patern, mitoz sayısı, nükleer pleomorfizm), omentum tutulumu, periton sıvısında malign hücre varlığı açısından değerlendirildi. Tümör derecelendirmesinde Shimizu-Silverberg sistemi kullanıldı.¹⁰ Bu derece-

leme sistemine göre baskın olan büyüme paterni glandüler ise 1 puan, papiller ise 2 puan, solid ise 3 puan verildi. Sitolojik atipinin hafif, orta derecede veya belirgin olmasına göre sırasıyla 1, 2 ve 3 puan verildi. Mitotik figürler 10 büyük büyütme alanında 9 veya daha az ise 1 puan, 10-24 arasında ise 2 puan, 25 veya daha fazla ise 3 puan verildi. Bu puanlar toplandığında sonuç 3-5 arasında ise tümör derece I olarak değerlendirildi. 6, 7 puan derece II; 8, 9 puan ise derece III olarak rapor edildi. Evreleme FIGO'ya (International Federation of Gynecology and Obstetrics) göre yapıldı. Benign ve borderline tümörlerde olguların yaşı ve tümör boyutu belirlendi.

Tümör örneklerinden morfolojiyi en iyi yansıtan parafin blok seçilerek 5 mm kalınlığında kesitler hazırlandı. Streptavidin-peroksidaz yöntemi ile immünohistokimyasal çalışma yapıldı. Buna göre; kesitler 60°C de 15 dk etüvde bekletildi. Yüzde yüz ksilende ve %100'lık alkol içinde bekletilerek deparafinizasyon yapıldı. Distile su ile 30 dk yıkanarak rehidratasyon sağlandı. On-onbeş dakika H₂O₂ ile inkübasyon ile endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Preparatlar, sitrat tampon (PBS) içinde 100 C etüvde 1 dk bekletildi. Soğutulduktan sonra 5 dk tris tamponlu salin içinde yıkandı. Kesitler primer monoklonal antikor ile muamele edildi. p53 için Ab-5, klon DO-7 (Neomarkers), nm23 için Ab-1 (Neomarkers), bcl-2 için bcl-2α Ab-1, klon 100/D5 (Neomarkers) kullanıldı. Kesitler yıkandıktan sonra biyotinillenmiş keçi antipolivalen konjugatı içinde 10 dk inkübe edildi. Bu işlem streptavidin-peroksidaz kompleksi ile 10 dk tekrarlandı. Kesitler kurutulurken kromojen uygulandı. Distile su ile durulandı ve Mayer hematoksilen ile kontrast boyanma sağlandı. Musluk suyunda yıkandı ve %1 amonyakta hematoksilenin rengi açıldı. Gliserol ile kapama yapıldı. Pozitif kontrol olarak p53 için larinks skuamöz hücreli karsinomu, nm23 için kolon adenokarsinomu, bcl-2 için tonsilla palatina kullanıldı.

İmmünohistokimyasal değerlendirmede tümör hücrelerinde p53 için nükleer, nm23 için sitoplazmik, bcl-2 için sitoplazmik boyanma ve sitoplazmik membran boyanması dikkate alındı. Tümör hücrelerinde %1'den fazla boyanma olması pozitif

olarak kabul edildi. Tümör hücrelerinde boyanma %1-10 arasında ise (+), %11-50 arasında ise (++), %50'den fazla ise (+++) olarak skorlandı.

İstatistiksel çalışmada elde edilen veriler "SPSS for Windows 12.0" ortamında bilgisayara kaydedildi. Ölçümler belirlenirken değişkenler ortalama ± standart sapma (mean, minimum, maksimum) olarak verildi. Çapraz tablolarda "ki-kare" ve "Fisher's exact test"; üç farklı tümör grubundaki olguların yaş ortalamaları "ANOVA"; p53, nm23, bcl-2 tümör boyutu "Kruskal Wallis" testi ile; malign tümörlerde derece ve evre "Mann Whitney U" testi ile değerlendirildi. "ANOVA" ve "Kruskal Wallis" testleri sonrası fark bulunduğu durumlarda farkın hangi gruptan kaynaklandığı "Post hoc" çoklu karşılaştırma testleri ile araştırıldı. p53, bcl-2 ve nm23 arasındaki korelasyon "Spearman's korelasyon" testi ile belirlendi. Bütün testlerde p değeri 0.05'ten küçük ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Olguların 23'ü benign, 11'i borderline ve 13'ü malign müsinöz tümördü. Yaş ortalaması benign tümörlerde 40.7, borderline tümörlerde 41.4, karsinomlarda 50.6 yıl olarak bulundu. Benign müsinöz tümörlerin 14.9 cm, borderline tümörlerin 21.6 cm ve müsinöz karsinomların 21.6 cm ortalama tümör boyutu olduğu tespit edildi. Malign müsinöz tümörlerin evreye göre dağılımına bakıldığında 13 olgunun sekizinin (%61.5) evre I olduğu görüldü. Olguların ikisi (%15.4) evre III, üçü (%23.1) evre IV olarak değerlendirildi (Tablo 1).

Benign müsinöz tümörlerde p53 pozitifliği olmadığı görüldü. Borderline müsinöz tümörlerde ve müsinöz karsinomlarda sadece birer olguda p53 ekspresyonu olduğu belirlendi (Tablo 2). Borderline müsinöz tümör (+) (Resim 1), karsinom ise (++) idi (Resim 2). Müsinöz karsinomda p53 ekspresyonu olan tek olgu evre III ve derece II idi. Evre ve derece açısından p53 pozitif ve negatif gruplar arasında fark yoktu (p= 0.051 ve 0.308). Bu olguda tümörün unilateral yerleştiği, omentum tutulumu olduğu ve periton sıvısında malign hücre bulunduğu görüldü. Çalışmamızda (+++) p53 ekspresyonu saptanmadı.

TABLO 1: Müsinöz karsinomlarda klinik ve histopatolojik parametreler

| | | n | % |
|--------------------------------|------------|----|-------|
| Bilateralite | unilateral | 12 | 92.3 |
| | bilateral | 1 | 7.7 |
| Omentum tutulumu | - | 9 | 69.2 |
| | + | 4 | 30.8 |
| Periton sıvısında malign hücre | - | 8 | 61.5 |
| | + | 5 | 38.5 |
| Evre | I | 8 | 61.5 |
| | II | 0 | 0 |
| | III | 2 | 15.4 |
| | IV | 3 | 23.1 |
| Derece | I | 9 | 69.2 |
| | II | 4 | 30.8 |
| | III | 0 | 0 |
| Büyüme paterni | glandüler | 4 | 30.8 |
| | papiller | 9 | 69.2 |
| | solid | 0 | 0 |
| Pleomorfizm | hafif | 4 | 30.8 |
| | orta | 7 | 53.8 |
| | belirgin | 2 | 15.4 |
| Mitotik aktivite (10 BBA) | ≤9 | 7 | 53.8 |
| | 10-24 | 6 | 46.2 |
| | ≥24 | 0 | 0 |
| Toplam | | 13 | 100.0 |

Bcl-2 ekspresyonu benign, borderline ve malign müsinöz tümörlerde sırasıyla %39.1, %36.4 ve %30.8 olarak bulundu (Resim 3). Malign tümörlere doğru gidildikçe bcl-2 ekspresyonu azalsa da gruplarda bcl-2 ekspresyonu istatistiksel olarak farklı değildi ($p=0.882$). Karsinomlarda bcl-2 pozitif olan dört olgudan üçü evre I iken, tek olgu evre IV'tü. Erken evrede daha fazla bcl-2 ekspresyonu var gibi göründe de istatistiksel fark bulunamadı

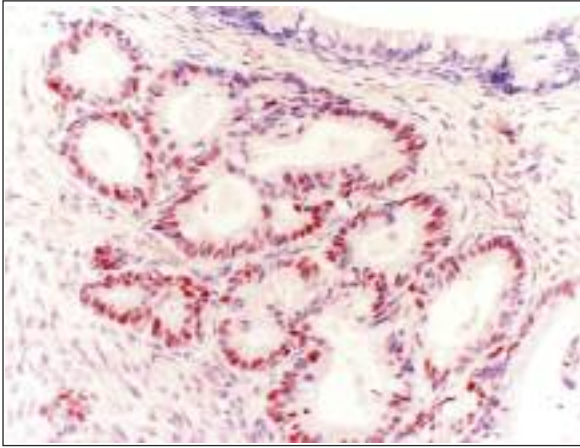
($p=0.586$). Bcl-2 ekspresyonu olan olguların üçü derece I, biri derece II, bcl-2 ekspresyonu olmayan dokuz olgunun ise altısı derece I, üçü derece II idi. Malign müsinöz tümörlerde bcl-2 ekspresyonu ile derece arasında ilişki yoktu ($p=0.646$). Bcl-2 ekspresyonu olan ve olmayan gruplarda yaş, tümör boyutu, bilateralite, omentum tutulumu, periton sıvısında malign hücre varlığı ve bazı histopatolojik parametreler (tümör gelişim paterni, pleomorfizm, mitoz sayısı) açısından fark bulunamadı.

nm23 ekspresyonu, benign tümörlerde %52.2, borderline tümörlerde %81.8 ve karsinomlarda %84.6 olarak saptandı (Resim 4). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0.164$). Müsinöz karsinomlarda nm23 ekspresyonu olan 10 olgunun yedisi evre I'di. Kalan üç olgudan biri evre III, diğeri ise evre IV'tü. nm23 ekspresyonu (+++) olan tek olgunun evre I olduğu görüldü. Evre ile boyanma yaygınlığı arasında ilişki yoktu ($p=0.356$).

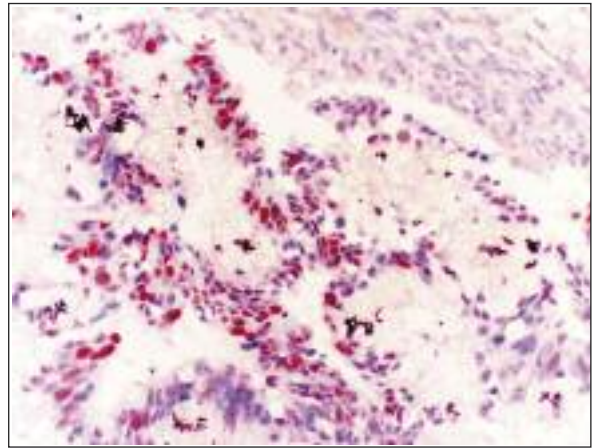
Olgular erken (evre I, II) ve ileri evre (evre III, IV) olarak iki grupta değerlendirildiğinde ise nm23 boyanma yaygınlığının ileri evre olgularda anlamlı derecede daha fazlaydı ($p=0.032$). Karsinomlarda nm23 ekspresyonu ile derece arasında ilişki yoktu ($p=0.672$). Müsinöz karsinomlarda sadece bir olgu bilateral yerleşimliydi. Bu olguda (+) nm23 ekspresyonu saptandı. On üç olgunun sadece dördünde omentum tutulumu vardı. (+++) nm23 ekspresyonu olan olguda omentum tutulumu yoktu. (+) ekspresyon saptanan 10 olgunun ise ikisinde omentumda tümör saptandı. nm23 ile pozitifite gösteren olgularda omentum tutulumu, nm23 negatif olanlara göre belirgin olarak daha az olmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gösterilemedi ($p=0.064$).

TABLO 2: Müsinöz tümörlerin p53, bcl-2 ve nm23 ekspresyonu.

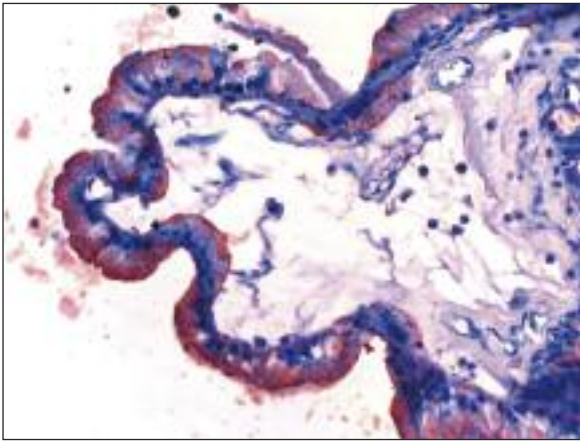
| | | p53 | | bcl-2 | | nm23 | | Toplam |
|--------------------------|---|-------|-----|-------|------|------|------|--------|
| Malign müsinöz tümör | n | 12 | 1 | 9 | 4 | 2 | 11 | 13 |
| | % | 92.3 | 7.7 | 69.2 | 30.8 | 15.4 | 84.6 | 100.0 |
| Borderline müsinöz tümör | n | 10 | 1 | 7 | 4 | 2 | 9 | 11 |
| | % | 90.9 | 9.1 | 63.6 | 36.4 | 18.2 | 81.8 | 100.0 |
| Benign müsinöz tümör | n | 23 | 0 | 14 | 9 | 11 | 12 | 23 |
| | % | 100.0 | .0 | 60.9 | 39.1 | 47.8 | 52.2 | 100.0 |



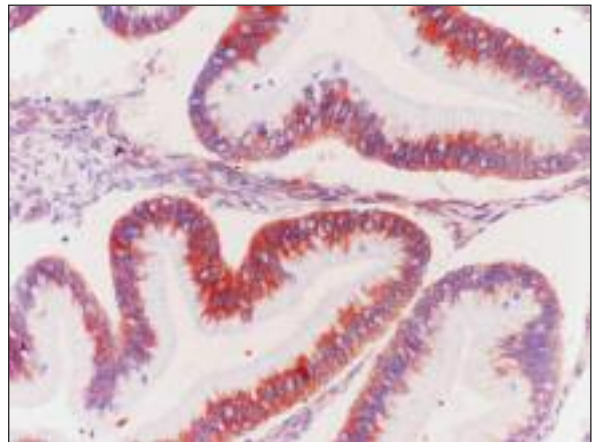
RESİM 1: Borderline müsinöz tümörde p53 ekspresyonu (p53x100).



RESİM 2: Müsinöz karsinomda p53 ekspresyonu (p53x100).



RESİM 3: Derece I müsinöz karsinomda bcl-2 ile sitoplazmik boyanma (bcl-2x200).



RESİM 4: Derece I müsinöz karsinom olgusunda nm23 ekspresyonu (nm23x200)

Olgular nm23 ekspresyonuna göre pozitif ve negatif olarak gruplandırıldığında, nm23 pozitif olguların %18.2'sinin, nm23 negatif olguların ise %30.8'inin omentum tutulumu olduğu görüldü. Buna göre nm23 ekspresyonu olan olgularda omentum tutulumu istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşüktü ($p= 0.021$).

nm23 ekspresyonu olan ve olmayan gruplarda yaş, tümör boyutu, bilateralite, periton sıvısında malign hücre varlığı ve bazı histopatolojik parametreler (tümör gelişim paterni, pleomorfizm, mitoz sayısı) açısından fark yoktu.

Maligen müsinöz tümörlerde p53 ve nm23 ekspresyonları karşılaştırıldığında p53 pozitif olan tek

olguda nm23 negatifti. p53 negatif olan 12 olgudan ise 10'unda (% 83.3) (+), birinde (% 8.3) (+++) nm23 ekspresyonu mevcuttu. Yapılan istatistiksel çalışmalarda malign müsinöz tümörlerde p53 ve nm23 ekspresyonu açısından korelasyon yoktu ($p= 0.051$). Sonuçlar pozitif ve negatif şeklinde değerlendirildiğinde ise p53 negatif olguların anlamlı derecede nm23 pozitif olduğu görüldü ($r= -0.677$, $p= 0.011$). bcl-2 ekspresyonu izlenen dört olgunun hiçbirinde p53 ekspresyonu görülmedi. bcl-2 ekspresyonu olmayan 9 olgunun ise birinde p53 ekspresyonu mevcuttu. Müsinöz karsinomlarda p53 ve bcl-2 arasında korelasyon bulunamadı ($r= -0.192$, $p= 0.488$). (+) nm23 ekspresyonu olan 10 olgunun üçünde, (+++) nm23 ekspresyonu olan bir olguda

bcl-2'nin de pozitif olduğu saptandı. nm23 ekspresyonu olmayan her iki olguda bcl-2 negatif idi. Müsinöz karsinomlarda nm23 ve bcl-2 arasında korelasyon olmadığı görüldü ($r=0.284$, $p=0.347$).

TARTIŞMA

Tüm dünyada over karsinomu olgularının beş yıllık sağ kalımı %32-46 arasında değişmektedir.¹¹ Olguların yaklaşık %70'i ileri evrede tespit edilebilmektedir. Erken dönemde daha büyük boyutlara ulaşabilen müsinöz karsinomların ise yarısından fazlası tanı sırasında evre I'dedir. Evre I'de tanı alan over karsinomlarının ise %27'si müsinöz tiptir.¹² Çalışmamızda karsinomların %61.5'i evre I, %15.4'ü evre III ve %23.1'i evre IV' tür. Evre II olgu yoktur.

p53, kanserde görülen en sık genetik değişikliktir. Over karsinomlarında p53 ekspresyonu %16-73 arasında değişen oranlarda rapor edilmiştir.^{3,5,13,14} Literatürde p53'ün over karsinomlarında pronostik önemi olduğu¹⁵ ve olmadığı¹⁶ yönünde yayınlar mevcuttur. Yapılan çalışmaların derlendiği bir makalede toplam 6839 over karsinomunda ortalama %51 p53 aşırı-ekspresyonu bildirilmiştir.⁴ Histolojik alt tiplere göre p53 ekspresyonu değişmektedir. En yüksek oranda p53 pozitifliği seröz karsinomlardadır (%56). Müsinöz karsinomlarda ise %29 p53 ekspresyonu vardır.⁴

Inoue ve ark., over tümörlerinde p53 ekspresyonunu araştırdığı çalışmasında benign ve borderline over tümörlerinde p53 ekspresyonu olmadığını, müsinöz karsinomlarda 13 olgudan dördünde (%31) p53 ekspresyonu bulunduğunu, bu olguların birinde (+), ikisinde (++) ve birinde (+++) boyanma saptadığını bildirmiştir.¹⁵ Çalışmamızda ise 13 karsinom olgusundan p53 ekspresyonu saptanan tek olgu evre III'tedir.

İmmünohistokimyasal yöntem ile elde edilen sonuçların kullanılan monoklonal antikor ile değişebilmektedir.⁴ p53'ün DO-7 ve PAb-1801 monoklonal antikorları en sık kullanılan klonlardır. Bu antikorlar hem "wild" tip hem de mutant p53 proteinini saptar. Çalışmamızda p53'ün DO-7 monoklonal antikorunu kullanılmıştır ve elde edilen sonuçlar p53 mutasyonu olan ve olmayan durum-

larda (örn: DNA tamir süreci) ortaya çıkan p53 aşırı-ekspresyonunu yansıtmaktadır.

p53 mutasyonunu spesifik olarak tespit etmek için PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ve SSCP (single-strand conformation polymorphism) tekniklerinin kullanılması gereklidir. Bu yöntemler ile elde edilen sonuçlara göre müsinöz karsinomlarda p53 aşırı-ekspresyonu ve mutasyonu sırası ile %31 ve %16'dır.¹⁷ p53 mutasyonu ve aşırı-ekspresyonu arasındaki farkın nedeni antikorlar ile tespit edilebilecek düzeyde protein ürünü oluşturamayan "null" mutasyonlar olabilir.¹⁸ "Stop" kodon oluşturan mutasyonlar veya "frame shift" mutasyonların immünohistokimyasal olarak saptanamaması, ortaya çıkan mutasyonların p53 protein stabilizasyonunu sağlayamaması veya kullanılan antikorların tüm mutant proteinleri içermemesi nedeniyle immünohistokimyasal teknikler ve mutasyon analizlerinde sonuçlar farklı elde edilebilir.¹⁷ DNA tamiri, p53 proteininin başka moleküller (SV40 large antijen, MDM2) ile kompleks oluşturması gibi durumlarda mutasyon olmadan immünohistokimyasal teknik ile pozitivite saptanabilir.¹⁹ İmmünohistokimyasal teknikler ile elde edilen p53 ekspresyon sonuçlarının spesifik mutasyon analizleri ile elde edilen sonuçlarla bire bir uyumlu değildir ancak aşırı-ekspresyon ve mutasyon arasındaki korelasyonun istatistiksel olarak anlamlıdır.²⁰

Çalışmamızda müsinöz karsinomlarda %7.7 p53 pozitifliği saptanmıştır. Elde edilen sonuç literatüre göre beklenenden düşüktür. Bunun nedeni olarak öncelikle olgu sayısının azlığı düşünülmüştür. Bununla birlikte birçok faktör p53 ile yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlara etki etmektedir. Öncelikle çeşitli çalışmalarda kullanılan farklı dokular ile farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Frozen kesitlerde çalışılan taze dokuda p53 antijeninin daha iyi saptanabildiği bilinmektedir.²¹ Boyama tekniğinde kullanılan farklı enzimler, mikrodalga uygulamalar boyanma sonucunu belirgin şekilde etkilemektedir.²² Farklı sonuçlar rapor edilmesinin bir başka nedeni de çalışmalarda belirlenen farklı "cut off" değerleridir.

Bcl-2, apoptozis inhibisyonunda görevli bir gen ve gen ürünü mitokondri membranında

yerleşir. İlk kez B hücreli lenfomalarda t(14,18) translokasyonunda overeksprese olduğu gösterilen bcl-2 geninin, meme karsinomu ve küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu gibi tümörlerde iyi prognoz göstergesi olduğu belirtilmektedir.²³

Marx ve ark.'a göre seröz karsinomlarda %30, müsinöz karsinomlarda ise %28 bcl-2 ekspresyonu mevcuttur.²⁴ Diebold ve ark. benign müsinöz tümörlerde %0 ve müsinöz karsinomlarda %27.8 bcl-2 ekspresyonu saptamıştır.²⁵ Chan ve ark. benign, borderline ve malign over tümörlerinde sırasıyla %100,%78 ve %33 bcl-2 ekspresyonunu rapor etmiştir.²³ Çalışmamızda ise müsinöz benign tümörlerde %39.1, borderline ve malign müsinöz tümörlerde sırasıyla %36.4 ve %30.8 bcl-2 ekspresyonu mevcuttur. Benign tümörlerden malign tümörlere doğru gidildikçe bcl-2 ekspresyonu azalıyor gibi görünse de anlamlı fark yoktur (p= 0.882).

Çalışmamızda müsinöz karsinomlarda erken evrede %37.5, ileri evrede %20 bcl-2 ekspresyonu mevcuttur. Diebold ve ark., Chan ve ark.'a göre derece arttıkça bcl-2 ekspresyonu azalmaktadır.^{23,25} Çalışmamızda müsinöz karsinomlarda ise derece I olgularda % 33.3, derece II olgularda ise %25 bcl-2 ekspresyonu vardır; ancak istatistiksel çalışmalarda histolojik derece ve bcl-2 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır (p= 0.787).

Geisler ve ark. over karsinomu olgularında %9.7 bcl-2 ekspresyonu olduğunu, bcl-2 ile histopatolojik prognostik parametreler arasında ilişki olmadığını, bcl-2'nin sağ kalımı belirlemede rolü olmadığını rapor etmiştir. Ancak p53 ile bcl-2 kombinasyonunun sağ kalımı belirlemede bağımsız bir parametre olduğunu belirtmiştir.⁵ Çalışmamızda da benzer şekilde histopatolojik prognostik parametreler ile bcl-2 arasında ilişki bulunamamıştır ancak ileri yorum yapabilmek için daha fazla olguya ihtiyaç olduğu düşünülmüştür.

nm23'ün antimetastatik etkisinin çeşitli tümörlerde değişebildiği bildirilmektedir. nm23'ün azalmış ekspresyonunun meme karsinomu ve malign melanomda kötü prognostik etkisi olduğu ve metastazı arttırdığı yönünde yayınlar olduğu bildirilmiştir.²⁴ Bununla birlikte nöroblastom, kolon

karsinomu, tiroid, akciğer karsinomlarında tam tersi korelasyon olduğu belirtilmektedir. Buna göre nm23'ün dokuya spesifik olarak fonksiyon gösterdiği, farklı tümörlerde değişik düzenleyici mekanizmalarda yer alıyor olabileceği fikri ortaya atılmıştır.²⁶ nm23'ün jinekolojik tümörlerdeki rolü tam olarak belirlenememiştir. Over karsinomu olgularında lenf nodu metastazı olan olguların olmayanlara göre daha düşük nm23 ekspresyonu olduğu, agresif tümörlerde nm23 ekspresyonunun azaldığını rapor edilmiştir.²⁷ Taş ve ark. çalışmasında over karsinomunda %84 nm23 ekspresyonu olduğunu, nm23 ekspresyonu ile histolojik derece, tümörün alt tipi ve evre, olguların yaşı arasında ilişkili olmadığını bildirmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte güçlü nm23 ekspresyonu olan olgularda prognoz daha iyidir.²⁸ nm23 ekspresyonunun over karsinomlarında, normal over dokusu ile benign ve borderline tümörlere göre daha yüksek olduğu, agresif karsinom fenotipi ile yüksek nm23 ekspresyonunun birliktelik gösterdiği yönünde de yayınlar mevcuttur.²⁹

Çalışmamızda nm23 ekspresyonu, müsinöz karsinomlarda %84.6, borderline müsinöz tümörlerde %81.8 ve benign müsinöz tümörlerde %52.2 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar literatüre göre daha yüksek olmakla birlikte Taş ve ark.'nın verileri ile uyumludur.

Schneider ve ark. tümörün malignitesi ile nm23 aşırı-ekspresyonunun korelasyon gösterdiğini, bu nedenle over karsinomunun nm23 ekspresyonu açısından nöroblastom ve kolon karsinomu ile aynı gruba girdiğini belirtmiştir.⁸ Malign fenotip ile birliktelik göstermesinin yanı sıra nm23, bu tümörlerde yayılımı azaltan etki de yapmaktadır. Buna göre tümör, malignite açısından eşik değeri aşınca nm23 eksprese olmaya başlamakta ve hücrenin yayılımını engelleyecek mekanizmalar içinde yer almaktadır. Bu durum meme karsinomu gibi daha yavaş seyirli tümörlerde nm23'ün iyi prognoz göstergesi olmasını açıklar. Ancak over karsinomlarında daha hızlı tümör progresyonu vardır ve eşik değer hemen aşılır. Buna göre nm23 ekspresyonu ovarian karsinogenezde geç dönemde ortaya çıkar.⁸ Çalışmamızda karsinomlarda, benign ve borderline tümörlere göre daha yüksek nm23 ekspresyonu

saptanmış, meme karsinomunun tersine, ileri evre ve yüksek dereceli tümörlerde nm23'ün daha fazla eksprese olduğu izlenmiştir. Bulgularımız nm23'ün over karsinomlarında bir onkogen gibi davrandığı fikrini desteklemektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda müsinöz tümörlerde p53 ve bcl-2'nin ekspresyon farklılığı gösterilememiş, karsinom olgularında histopatolojik ve

klirik parametrelerle anlamlı ilişkisi bulunamamıştır. nm23 ile histopatolojik ve klinik parametreler arasında anlamlı ilişki saptanamamıştır. Bununla birlikte ileri evre olgularda daha kuvvetli boyanma olması ile nm23'ün karsinogenezde geç dönemde rol alıyor olabileceğini akla getirmiştir. Ancak kesin çıkarımlar yapılabilmesi için daha geniş serilerde çalışmalar gereklidir.

KAYNAKLAR

- McGuire V, Jessor CA, Whittemore AS. Survival among U.S. women with invasive epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2002;84(3): 399-403.
- Rosai J. Female reproductive system, ovary. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 9th ed. Philadelphia: Mosby; 2004. p.1649-736.
- Yoshida K, Miki Y. The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage. *Cancer Sci* 2010; 101(4):831-5.
- Kmet LM, Cook LS, Magliocco AM. A review of p53 expression and mutation in human benign, low malignant potential and invasive epithelial ovarian tumors. *Cancer* 2003;97(2): 389-404.
- Geisler JP, Geisler HE, Miller GA, Wiemann MC, Zhou Z, Crabtree W. p53 and bcl-2 in epithelial ovarian carcinoma: their value as prognostic indicators at a median follow-up of 60 months. *Gynecol Oncol* 2000;77(2):278-82.
- Henriksen R, Wilander E, Oberg K. Expression and prognostic significance of bcl-2 in ovarian tumours. *Br J Cancer* 1995;72(5):1324-9.
- Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1988;80(3):200-4.
- Schneider J, Romero H, Ruiz R, Centeno MM, Rodriguez-Escudero FJ. nm23 expression in advanced and borderline ovarian carcinoma. *Anticancer Res* 1996;16(3A):1197-202.
- Mandai M, Konishi I, Koshiyama M, Mori T, Arao S, Tashiro H, et al. Expression and metastasis-related nm23-H1 and nm23-H2 genes in ovarian carcinomas: correlation with clinicopathology, EGFR, c-erbB-3 genes and sex steroid receptor expression. *Cancer Res* 1994;54(7):1825-30.
- Shimizu Y, Kamoi S, Amada S, Akiyama F, Silverberg SG. Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma: testing of a proposed system in a series of 461 patients with uniform treatment and follow-up. *Cancer* 1998;82(5):893-901.
- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999;49(1):33-64.
- Vergote I, De Brabanter J, Fyles A, Bertelsen K, Einhorn N, Sevelde P, et al. Prognostic importance of degree of differentiation and cyst rupture in stage I invasive epithelial ovarian carcinoma. *Lancet* 2001;357(9251):176-82.
- Tuğyan N, Yiğit S, Tuğyan K, Sarı Akder A. [Conventional prognostic parameters in malignant ovarian surface epithelial tumors and relation of patient survival to p53 tumor suppressor gene]. *Türk Onkoloji Dergisi* 2002;17(3):113-6.
- Bahçe M. [Genetics in ovarian tumors]. *Turkiye Klinikleri J Surg Med Sci* 2007;3(31):5-9.
- Şimşek T, Özbilim G, Karaveli Ş, Trak B. Genetic changes in advanced stage of epithelial ovarian cancer. p53 and C-erb B2: are they related to prognosis. *Gynecol Obstet Reprod Med* 2001;7(3):256-9.
- Berker B, Dündar I, Ensari A, Cengiz SD. P53 accumulation in epithelial ovarian carcinomas and its prognostic implications. *Gynecol Obstet Reprod Med* 2001;7(2):149-51.
- Schuijer M, Berbs E. Tp53 and ovarian cancer. *Hum Mut* 2003;21(3):285-91.
- Skilling JS, Sood A, Niemann T, Lager DJ, Buller RE. An abundance of p53 null mutations in ovarian carcinoma. *Oncogene* 1996; 13(1): 117-23.
- Skomedal H, Kristensen GB, Abeler VM, Børresen-Dale AL, Tropé C, Holm R. TP53 protein accumulation and gene mutation in relation to overexpression of MDM2 protein in ovarian borderline tumours and stage I carcinomas. *J Pathol* 1997;181(2):158-65.
- Wen WH, Reles A, Runnebaum IB, Sullivan-Halley J, Bernstein L, Jones LA, et al. p53 mutations and expression in ovarian cancers: correlation with overall survival. *Int J Gynecol Pathol* 1999;18(1):29-41.
- Inoue M, Fujita M, Enomoto T, Morimoto H, Monden T, Shimano T, et al. Immunohistochemical analysis of p53 in gynecologic tumors. *Am J Clin Pathol* 1994;102(5):665-70.
- Sagarra RA, Andrade LA, Martinez EZ, Pinto GA, Syrjänen KJ, Derchain SF. p53 and bcl-2 as prognostic predictors in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2002;12(6):720-7.
- Chan WY, Cheung KK, Schorge JO, Huang LW, Welch WR, Bell DA, et al. Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers. *Am J Pathol* 2000;156(2):409-17.
- Marx D, Binder C, Meden H, Lenthe T, Ziemek T, Hiddemann T, et al. Differential expression of apoptosis associated genes bax and bcl-2 in ovarian cancer. *Anticancer Res* 1997; 17(3C):2233-40.
- Diebold J, Baretton G, Felchner M, Meier W, Dopfer K, Schmidt M, et al. bcl-2 expression, p53 accumulation and apoptosis in ovarian carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1996;105(3): 341-9.
- Hennessy C, Henry JA, May FE, Westley BR, Angus B, Lennard TW. Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer: an association with good prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1991;83(4):281-5.
- Scambia G, Ferrandina G, Marone M, Benedetti Panici P, Giannitelli C, Piantelli M, et al. nm23 in ovarian cancer: correlation with clinical outcome and other clinico-pathological and biochemical prognostic parameters. *J Clin Oncol* 1996;14(2):334-42.
- Tas F, Tuzlali S, Aydinler A, Saip P, Salihoglu Y, Iplikci A, et al. Prognostic role of nm23 gene expression in patients with ovarian cancer. *Am J Clin Oncol* 2002;25(2):164-7.
- Salerno M, Ouatat T, Palmieri D, Steeg P. Inhibition of signal transduction by the nm23 metastasis suppressor: possible mechanisms. *Clin Exp Met* 2003;20(1):3-10.