

RENAL ADENOKARSİNOMDA PROLİFERATING CELL NUCLEAR ANTİGEN (PCNA) BOYANMASI İLE EVRE ARASINDAKİ İLİŞKİ

THE CORRELATION BETWEEN PROLİFERATING CELL NUCLEAR ANTİGEN (PCNA) STAINING AND STAGE IN RENAL ADENOCARCINOMA

KAYA, E.*, CANDAN, L.**; ATAKAN, İ.H.*, ALAGÖL, B.*, KAPLAN, M.*, İNCİ, O.*

*Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, EDİRNE

**Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, EDİRNE

ÖZET

Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) immünoreaktivitesi, proliferen olan normal hücreler ve tümör hücrelerinin nükleuslarında gözlenir. PCNA boyanmasının renal adenokarsinomda evre ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Bu ilişkinin gösterilmesi amacıyla kliniğimizde radikal nefrektomi sonrası histopatolojik olarak adenokarsinom tanısı alan 50 hastada, Robson evrelemesi ile PCNA immünoreaktivitesi arasındaki ilişki araştırıldı. PCNA ile boyanma negatif, hafif, orta ve şiddetli olarak 4 grupta değerlendirildi.

Elli olgunun 46'sı (%92) PCNA ile boyanırken, sadece 4 olguda (%8) boyanma görülmedi. Bu 4 olgunun 2'si evre I, 1'i evre IIIa ve 1'i evre IIIc idi. Organ metastazı olan olguların (evre IV) tamamında PCNA pozitif. Evre artışı ile pozitiflik artmaktaydı, ancak bu istatistiksel olarak anlamsızdı. PCNA negatif ve hafif pozitif olgular (grup I boyanma) ile orta ve şiddetli pozitif olgular (grup II boyanma) iki ayrı grupta toplandı. Evre IIIa ve öncesi olgularda grup I / grup II oranı (8/12), evre IIIb ve sonrası olanlardan (4/26) belirgin derecede yüksekti ve bu istatistiksel olarak anlamlıydı. Ayrıca olgularımızda evre artışı ile PCNA boyanma şiddeti arasında da istatistiksel olarak anlamlı korelasyon vardı.

Evre IIIa ve öncesi ile IIIb ve sonrası PCNA ile anlamlı derecede farklı boyanması lenf nodu tutulumunun boyanmayı arttırdığını göstermektedir. Ayrıca birçok çalışmada da bildirildiği gibi, PCNA boyanmasının çoğu böbrek tümöründe pozitif olduğu ve boyanma şiddeti ile evre arasında bir ilişki olduğu kanısındayız.

Anahtar Kelimeler: PCNA, renal adenokarsinom

ABSTRACT

Nuclear Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) immunoreactivity is found in the proliferating compartment of normal and tumor cells. Immunohistochemical staining of PCNA is considered to be associated with stage.

The purpose of the present study was to examine immunohistochemical staining of PCNA in renal adenocarcinoma and its relationship to Robson staging system. PCNA was determined by immunohistochemical staining in 50 patients who underwent radical nephrectomy and described as adenocarcinoma histopathologically. Staining of PCNA was graded in 4 groups as negative, mild, moderate and severe.

Forty six of 50 patients (92%) had PCNA staining whereas in only 4 (8%) no staining was observed. Of these 4 patients, 2 were in stage I, one in stage IIIa and one in stage IIIc. All of the patients with metastatic organ involvement (stage IV) were PCNA positive. With the advance in stage, the grade of staining increased but this was not statistically significant. PCNA negative and mildly positive patients (group1 staining) and moderate and severe cases (group 2 staining) were analyzed separately. The ratio of group 1 to group 2 in or before stage IIIa (8/12) was significantly different from those in or after stage IIIb (4/26) and this difference was statistically significant. Besides, there was a statistically significant positive correlation between the advance in stage and the grade of staining.

The significantly different PCNA staining of the patients in or before stage IIIa and those in or before stage IIIb indicates that the lymph node involvement enhances staining. As reported in many other studies, we conclude that PCNA is positive in most of renal tumors and there is a correlation between the grade of staining and stage.

Key Words: PCNA, renal adenocarcinoma

GİRİŞ

Malign tümörlerin proliferatif kapasitesinin bilinmesi prognozu belirlemede en önemli yardımcıdır ve birçok tümörde tedaviye yanıt ve relapsın bir göstergesi olabilir¹.

1990'dan sonra *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) histolojik materyallerde hücre proliferasyonu için bir belirleyici olarak değerlendirilmeye başlandı. Bu, bazı tümörlerin biyolojik davranışını objektif olarak gösterebilmek açısından ilginç bulundu².

PCNA, DNA polimeraz δ için yardımcı bir proteindir ve hücre proliferasyonunun başlamasında önemli bir rol oynar³⁻⁶. Hücrelerde başlıca DNA replikasyonu veya sentezi olan yerlerde bulunur^{7,8}.

PCNA immünoreaktivitesi, proliferen olan normal hücreler ve tümör hücrelerinin nükleuslarında gözlenir⁹. PCNA boyanmasının renal adenokarsinomda evre ve prognoz ile ilgili olduğu düşünülmektedir¹⁰⁻¹⁷. PCNA boyanması ile evre arasında anlamlı bir ilişki olmadığı da savunulmaktadır⁹. Çalışmamızda PCNA ile evre arasındaki ilişkiyi aydınlatmak amacıyla, renal adenokarsinom tanısı alan hastalarımızda Robson evrelemesi ile PCNA arasındaki ilişki araştırıldı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kliniğimizde böbrek tümörü ön tanısı ile radikal nefrektomi uyguladığımız ve histopatolojik olarak renal adenokarsinom tanısı konan 50 olgu çalışmaya dahil edildi. Olguların evrelemesi Robson sistemine göre yapıldı¹⁸. Evreleme işlemi klinik, radyolojik ve patolojik bulgular ele alınarak yapıldı. Abdomen ve toraks bölgelerinin bilgisayarlı tomografisi ile primer tümör kitlesi yanında varsa organ metastazları, lenf nodu tutulumları, vena renalis ve vena cava tümör trombusları değerlendirildi.

%10'luk formalinde tespit edildikten sonra rutin olarak takip edilen ve parafinde bloklanan dokulardan hazırlanan, hematoksin + eosin ile boyanan, 5 mikron kalınlıktaki arşiv kesitleri yeniden incelendi. Her olgu için, tümörü en iyi temsil ettiğine inanılan bir blokta hazırlanan kesitler immünohistokimyasal olarak PCNA ile boyandı. Kesitler deparafinize ve rehidrate edildikten sonra, 0.01 M sitrat solüsyonu (pH: 6.0) içinde soğumaya bırakıldı. Daha sonra distile su

ve fosfatlı tampon (PBS) içinde yıkanan kesitler peroksidaz yöntemi kullanılarak 30 dakika monoklonal anti-PC10 (DAKO ürün kodu: N-1529) ile inkübe edildi. Daha sonra LSAB-2 kit (DAKO ürün kodu: K-0675) kullanılarak streptavidin-biotin yöntemi ile boyanmaya devam edildi. Renklendirici olarak AEC+substrate-kromojen (DAKO ürün kodu: K-3469) kullanıldı. Uygulama sırasında tüm inkübasyonlar oda ısısında, nemli ve kapalı bir ortamda yapıldı.

PCNA için pozitif kontrol olarak yüksek dereceli meme invaziv duktal karsinom olgusu kullanıldı. Her olguya ait üzerine primer antikor damlatılmayan kesitler negatif kontrol olarak değerlendirildi.

Tümör hücrelerinin nükleuslarında diffüz koyu pembe boyanma, PCNA antijeninin pozitifliği için kriter olarak kullanıldı. Tümör genel görünümünü yansıtan alanlarda büyük büyütmede (x40 objektif ile) 100 hücre semikantitatif yöntemle sayıldı. %10'dan az hücrede boyanma, negatif (-) boyanma olarak kabul edildi. %10-25 arası hafif (derece I), %25-75 arası orta (derece II), %75'den fazla hücrede boyanma ise şiddetli (derece III) boyanma olarak kabul edildi.

Evre ile boyanma arasındaki ilişki Fisher chi-square testi ile değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirme yapabilmek için, boyanmayan olgu sayısının azlığı nedeniyle boyanmayan olgularla hafif boyananlar grup I boyanma, orta ve şiddetli boyananlar ise grup II boyanma olacak şekilde iki grupta değerlendirildi. Evreler arasında grup I ve II boyanma oranları karşılaştırıldı. Ayrıca evre ile boyanmanın derecesi arasındaki ilişki Spearman Correlations testi ile değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmamızda 50 olgunun 46'sı (%92) PCNA ile boyanırken, sadece 4 olguda (%8) boyanma görülmedi. Bu 4 olgunun 2'si evre I, 1'i evre IIIa ve 1'i evre IIIc tümörlerdi. Organ metastazı olan olguların (evre IV) tanamında PCNA pozitifliği. Bu sonuçlardan anlaşıldığı gibi evre ilerledikçe boyanan olgu sayısı artmaktaydı. Ancak, bu rakamlar istatistiksel olarak anlamsızdı. Evrelere göre olguların boyanma derecesi tablo 1'de sunulmuştur.

	Ne- gatif	dere- ce I	dere- ce II	dere- ce III	toplamlam
Evre I	2	2	3	2	9
Evre II	-	2	3	1	6
Evre IIIa	1	1	1	2	5
Evre IIIb	-	-	2	1	3
Evre IIIc	1	-	1	3	5
Evre IVa	-	1	3	3	7
Evre IVb	-	2	6	7	15

Tablo 1: Robson evrelemesine göre PCNA boyanma dağılımı

Boyanan ve boyanmayan olguların evrelere göre dağılımında anlamlı bir sonuç elde edilemediğinden, olgular boyanma derecesine göre iki gruba ayrılıp, bu iki grubun evrelere göre dağılımı incelendi. PCNA negatif ve hafif pozitif (derece I) olgular grup I boyanma, orta (derece II) ve şiddetli pozitif (derece III) olgular ise grup II boyanma olarak ele alındı. Evre IIIa ve öncesi olgularda "grup I / grup II" oranı (8/12), evre IIIb ve sonrası olanlardan (4/26) belirgin derecede yüksekti ve bu istatistiksel olarak anlamlıydı (Tablo 2). Metastatik (evre IV) ve nonmetastatik (evre I,II,III) olgular arasında ise "grup I/grup II" oranı anlamlı derecede farklı değildi.

	Grup I boyanma	Grup II boyanma
Evre IIIa ve öncesi	8	12
Evre IIIb ve sonrası	4	26

Tablo 2: Evrelere göre grup I ve grup II boyanma

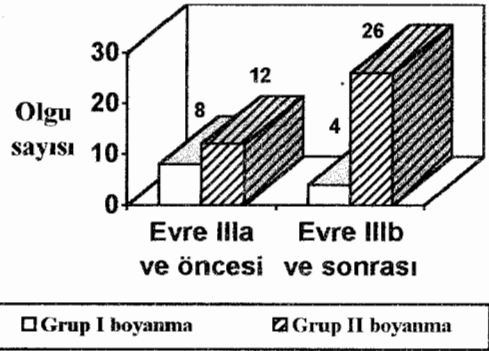
Bu sonuçlardan lenf nodu tutulumu olmayan olgularda (evre IIIa ve öncesi) boyanmanın, lenf nodu tutulumu olanlardan (evre IIIb ve sonrası) daha az olduğu ve metastatik olgularla nonmetastatik olanların boyanmasında fark olmadığı sonucu elde edildi.

Olgularımızın tümünde PCNA boyanma derecesinin (negatif, derece I,II,III) evrelere göre dağılımı incelendiğinde ise evre ilerledikçe boyanma derecesinin arttığını bulduk. Bu sonuçlar

Spearman Correlations testine göre istatistiksel olarak anlamlıydı. İleri evre tümörler PCNA ile daha koyu boyanıyorlardı.

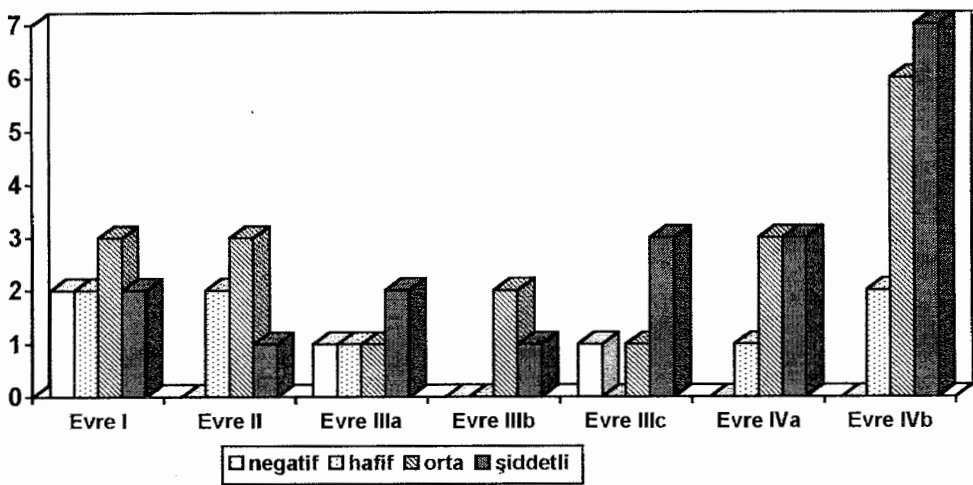
TARTIŞMA

%10'dan fazla hücrede boyanma olan tümörlerin daha ileri evre, daha çok invaziv ve metastatik olduğu bildirilmiştir¹⁶. Çalışmamızda da boyanma pozitif kabul ettiğimiz (%10'dan fazla hücrede boyanma) olgular ileri evrelerde daha sıkı ve boyanma olmayan olgu (%10'dan az hücrede boyanma) sayısı düşük evrelerde daha fazlaydı. Ancak boyanmayan olgu sayısının azlığı nedeniyle istatistiksel anlamı yoktu. Bu nedenle hafif (derece I) boyananlar ile negatif olgular bir araya getirilip (grup I boyanma), orta (derece II) ve şiddetli (derece III) boyananlar grubuyla (grup II boyanma) karşılaştırıldı. Bu şekilde bu iki grup arasında evrelere göre dağılımında anlamlı sonuçlar elde edildi. Lenf nodu tutulumu olan (evre IIIb ve sonrası) ve olmayan (evre IIIa ve öncesi) olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark elde edildi (Grafik 1). Ancak, bu boyanma farkı tüm evre basamakları arasında yoktu. Metastatik ve nonmetastatik olgular arasında da boyanmada anlamlı fark yoktu.



Grafik 1: Evrelere göre grup I ve grup II boyanma

pT2 ile pT3 ve pT4 arasında PCNA indeksinin anlamlı derecede farklı olduğu, ancak lenf nodu tutulumu ve metastazlar ile bir korelasyon olmadığı bildirilmiştir¹⁴. Burada lenf nodu tutulumu ile ilgili bilgiler sonuçlarımıza uymamaktadır. Çalışmamızda boyanmadaki en anlamlı farkı lenf nodu tutulumunun olmadığı (evre IIIa ve öncesi) olgularla, tutulum olanlar (evre IIIb ve sonrası) arasında bulduk.



Grafik 2:Evrelere göre boyanma dereceleri

Başka bir çalışmada PCNA ekspresyonu diğer evrelerden düşük olarak evre I’de %62,5 (20/32), evre II’de %60 (9/15) bulunmuş¹⁹. Bizim çalışmamızda da boyanma oranı evre I’de diğer evrelerden daha düşük (%77) bulundu. Ancak bu bildirilen sonuçlardan daha yüksekti.

Farklı grade ve evre tümörler arasında PCNA boyanma derecesinin anlamlı derecede farklı olduğu söylenmektedir¹⁰. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular bu görüşü desteklemektedir. Evre ilerledikçe PCNA boyanma derecesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmakta, ileri evre tümörlerde boyanmanın yoğun olduğu dikkati çekmektedir (Grafik 2). Çoğu çalışmadaki görüşler bu yönde olmasına rağmen evre ile boyanma arasında anlamlı bir ilişki olmadığını savunan yayınlar da vardır⁹.

Sonuç olarak; olguların büyük çoğunluğunun (%92) PCNA ile boyandığı görüldü. Boyanmayan olgu sayısının çok az oluşu nedeniyle, evreler arasında pozitiflikte anlamlı bir fark yoktu. Ancak olgular boyanma derecesine göre gruplandırıldığında (negatif ve hafif boyananlar grup I boyanma, orta ve şiddetli boyananlar grup II boyanma) bu iki grubun evrelere göre dağılımının farklı olduğu görüldü. Bu fark lenf nodu tutulumu olmayan olgularla (Evre IIIa ve öncesi), lenf nodu tutulumu olanlar (Evre IIIb ve sonrası) arasında en belirgindi. Ayrıca evre ile boyanma derecesi arasında da bir korelasyon olduğunu ve

ileri evre tümörlerin daha koyu boyandığını bulduk.

KAYNAKLAR

- 1- Haerslev T, Jacobsen GK: Proliferating cell nuclear antigen in breast carcinomas. An immunohistochemical study with correlation to histopathological features and prognostic factors. Virch Arch 424: 39-46, 1994.
- 2- Lipponen PK, Eskelinen MJ: Cell proliferation on transitional cell bladder tumours determined by PCNA/cyclin immunostaining and its prognostic value. Br J Cancer 66: 171-176, 1992.
- 3- Bravo R: Synthesis of the nuclear protein cyclin (PCNA) and its relationship. Exp Cel Res 163: 287-293, 1986.
- 4- Bravo R, Frank R, Blundel PA, Macdonald-BravoH: Cyclin/PCNA is the auxillary protein of DNA polymerase-δ . Nature 326: 515-520, 1987.
- 5- Garcia RL, Coltrera MD, Gown AM: Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues, Comparison with flow cytometric analysis. Am J Pathol 134: 733-739, 1989.
- 6- Prelich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, Stillman B: Functional identity of proliferating cells nuclear antigen and a DNA polymerase-δ auxillary protein. Nature 326: 517-520, 1987.
- 7- Fernandez EB, Sesterhenn IA, McCarthy WF, Mostofi FK, Moul JW: Proloferating cell nuclear antigen expression to predict occult disease in clinical stage I nonseminomatous testicu-

- lar germ cell tumors. *J Urol* 152: 1133-1138, 1994.
- 8- **Kurki P, Vanderlann M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM:** Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) during the cell cycle. *Exp Cell Res* 166: 209-219, 1986.
- 9- **Tanioka F, Hiroi M, Yamane T, Hara H:** Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), immunostaining and flow cytometric DNA analysis of renal cell carcinoma. *Zentralbl Pathol*, 139: 185, 1993.
- 10- **Shameem IA, Shimabukuro T, Wada T, Kuri-su H, Naito K:** Expression of proliferating cell nuclear antigen and deoxyribonucleic acid value in renal cell carcinoma: correlation with different histopathological parameters and patients survival. *Eur Urol*, 29: 78, 1996.
- 11- **Tanaphel A, Hahn HA, Katalinic A, Fietkau RJ, Kuhn R, Wittekind CW:** Prognostic value of ploidy and proliferation markers in renal cell carcinoma. *Cancer*, 77: 164, 1996.
- 12- **Nakano S, Kawamura J:** Proliferating cell nuclear antigen expression as a prognostic indicator for renal cell carcinoma: comparison with pathologic futures and DNA content. *Hinyokika Kyo*, 41: 343, 1995.
- 13- **Delahunt B, Bethwaite PB, Thornton A, Ribas JL:** Proliferation of renal cell carcinoma assessed by fixation-resistant polyclonal Ki-67 antibody labeling. Correlation with clinical outcome. *Cancer*, 75: 2714, 1995.
- 14- **Seki H, Nagamori S, Koyanagi T:** Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in renal cell carcinoma. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi*, 86:1475, 1995.
- 15- **Larsson P:** Cell proliferation in renal cell carcinoma. A clinical study with special reference to prognosis. *Scand J Urol Nephrol Suppl*, 165: 1, 1994.
- 16- **Kamel D, Turpeenniemi Hujanen T, Vahakangas K, Paakko P, Soini Y:** Proliferating cell nuclear antigen but not p53 or human papilloma-virus DNA correlates with advanced clinical stage in renal cell carcinoma. *Histopathology*, 25: 339, 1994.
- 17- **Delahunt B, Bethwaite PB, Nacey JN, Ribas JL:** Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression as a prognostic indicator for renal cell carcinoma: comparison with tumour grade, mitotic index, and silver-staining nucleolar organiser region numbers. *J Pathol*, 170: 471, 1993.
- 18- **Dreicer R, Williams RD:** Renal parenchymal neoplasms. In: *Smith's General Urology*. Ed. EA Tanagho, JW McAninch. Connecticut: Appleton & Lange Co, chapt.21, pp. 359-77, 1992.
- 19- **Flint A, Grossman HB, Liebert M, Lloyd RV, Bromberg J:** DNA and PCNA content of renal cell carcinoma and prognosis. *Am J Clin Pathol*, 103:14, 1995.