

Mide adenokarsinomlarında PTEN ekspresyonu ve prognostik parametrelerle ilişkisi

Cumhur Selçuk Topal¹, Müberra Seğmen Yılmaz², Murat Hakan Karabulut²,
Dilek Yavuzer³, Nimet Karadayı³

¹Validebağ Devlet Hastanesi, Patoloji Kliniği, ²Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği

³Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği

ÖZET:

Mide adenokarsinomlarında PTEN ekspresyonu ve prognostik parametrelerle ilişkisi

Amaç: PTEN (phosphatase and tensin); 10.kromozomda (10q23.3) lokalize tümör supresör gen olarak belirlenmiş önemli bir moleküler marker'dir. Bu retrospektif çalışmada mide adenokarsinomlarında PTEN ekspresyonu, PTEN ekspresyonunun prognostik parametre olarak anlamlılığı ve diğer prognostik parametrelerle ilişkisi araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Mide adenokarsinomu tanısı almış 60 olguya ait tümör içeren parafin bloklardan elde edilen kesitlere PTEN (Clone 28H6, Novocastra, UK) ile immunohistokimyasal boyama prosedürü uygulandı.

Bulgular: PTEN ekspresyonu ile Lauren sınıflaması ve histolojik grade arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı. Ancak PTEN ekspresyonu ile vasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu metastazı, TNM (primer tümör, lenf nodu, uzak metastaz) evresi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Sonuç: Çalışmamızda Lauren sınıflamasına göre diffuz tip karsinomlarda, intestinal tip karsinoma göre PTEN ekspresyon kaybının daha belirgin olduğu ve differansiyon azaldıkça PTEN ekspresyon kaybının arttığı saptanmıştır. Sonuçta PTEN ekspresyonunun malign transformasyonla, progresyonla ve diğer prognostik parametrelerden histolojik grade ile ilişkili olduğu görülmüştür.

Anahtar sözcükler: PTEN, mide adenokarsinomu

Ş.E.E.A.H. Tıp Bülteni 2009;43;77-81

ABSTRACT:

PTEN expression and its relationship with prognostic factors in gastric adenocarcinomas

Objective: PTEN (phosphatase and tensin) is an important molecular marker that works as a tumor suppressor gene located on the 10th chromosome (10q23.3). In this retrospective study, PTEN expression and its relationship with prognostic parameters have been investigated.

Study design: Slides obtained from paraffine blocks of 60 gastric adenocarcinoma immunohistochemically stained with PTEN (Clone 28H6, Novocastra, UK).

Results: Statistically significant relationship was found between Lauren's classification, histologic grade and PTEN expression. But we were unable to show significant relationship with PTEN and vascular invasion, perineural invasion, lymph node metastasis, TNM (primary tumor, lymph node, distant metastasis) stage.

Conclusions: We found that PTEN expression loss is more prominent in the diffuse type carcinomas than the intestinal types and also there is a reverse correlation between histologic differentiation and PTEN loss. As a result PTEN expression was found to be related to malignant transformation, tumor progression and histologic grade.

Key words: PTEN, gastric adenocarcinoma

Ş.E.E.A.H. Tıp Bülteni 2009;43;77-81

GİRİŞ

PTEN geni; 10. kromozomda (10q23.3) lokalize tümör supresör gen olarak belirlenmiş olup 1997 yılında üç araştırma grubunca tanımlanmıştır. Araştırmacılar bu geni sırasıyla, PTEN (phosphatase and tensin homo-

log deleted on chromosome 10), MMAC1 (mutated in multiple advanced cancers) ve TEP1 (TGF-β regulated and epithelial cell enriched phosphatase 1) olarak adlandırmışlardır (1-3). PTEN, fosfolipitfosfataz aktivitesi göstererek pekçok sinyal üretim yolunda rol alır. Son yıllarda PTEN'in tümör supresör etkisi ile ilgili birkaç mekanizma tanımlanmıştır. Bunlar;

- Fosfoditilinozitol 3-4-5 trifosfat (PIP3)'ı defosforile ederek hücre büyümesini artırır ve apoptozu inhibe eder.
- Fokal adezyon kinazı (FAK) defosforile ederek metastaz ve hücre invazyonu inhibe eder.
- Mitojen aktive protein kinaz (MAPK)'ı inhibe eder.

Yazışma Adresi / Address reprint requests to: Dr. Müberra Seğmen Yılmaz
Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Kliniği, İstanbul-Türkiye

Telefon / Phone: +90-216-632-1818/1311

E-posta / E-mail: muberraseg@gmail.com

Geliş tarihi / Date of receipt: 11 Şubat 2009 / February 11, 2009

Kabul tarihi / Date of acceptance: 16 Mart 2009 / March 16, 2009

rek hücre diferansiasyonunu durdurur.

PTEN proteindeki mutasyon veya anormal ekspresyonlar birçok tümörde araştırılmış olup tümörögenesiz ve progresyonla anlamlı ilişkiler bulunmuştur. Meme kanseri, böbrek kanseri, mesane kanseri, malign melanom, glioblastoma, akciğer, endometrium, prostat karsinomlarında PTEN mutasyonları saptanmıştır (1-10). Multiple hamartomlarla karakterize, artmış meme ve tiroid karsinom riski taşıyan Cowdens sendromunda, otozomal dominant geçişli Juvenil polipozis ve Bannayan-Zonana sendromunda da PTEN'in germline mutasyonları gösterilmiştir (11,12). Gastrik karsinomlarda immunohistokimyasal yöntemle yapılan çalışmalarda PTEN ekspresyonunun mikroskopik karsinom tipi, diferansiasyon, evre, metastaz, invazyon derinliği gibi prognostik parametrelerle negatif yönde korele olduğu bulunmuştur (13-19).

Bu çalışmada 60 adet gastrik adenokarsinom olgusunda; Lauren sınıflamasına göre mikroskopik karsinom tipi, histolojik grade, vasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu tutulumu, TNM evre gibi prognostik parametrelerle birlikte PTEN ekspresyonunun progresyondaki rolü araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Kliniği arşivinde mevcut 60 adet total ve subtotal gastrektomi piyesi retrospektif olarak incelendi. Bütün hastaların klinik bilgileri, makroskopik bulguları hastane ve patoloji kliniği arşiv kayıtlarından elde edildi.

Olguların Hematoksilen&Eozin ile boyalı tüm kesitleri ışık mikroskobunda tekrar incelendi. Tüm tümörlerin histolojik tipi, grade'i ve evresi tekrar değerlendirildi. Tümörlerin histolojik tiplendirilmesinde Lauren sınıflaması kullanıldı. Buna göre olgular; intestinal tip, diffüz tip ve mikst tip olarak sınıflandırıldı. Tümörler diferansiasyonlarına göre; iyi-orta derecede diferansiye ve az diferansiye olarak ayrıldı. Tümörlerin evreleri TNM sistemine göre yapıldı.

İmmunohistokimyasal çalışmaya dahil edilen 60 adet gastrik adenokarsinom olgusunda PTEN ekspresyonunu belirlemek amacıyla parafin bloklara gömülen dokulardan 5 mikrometre kalınlığındaki kesitler "Poly-L-Lysine" li lamlara alındı. Hazırlanan kesitlere PTEN (Clone 28H6, Novocastra, UK) antikoru üretici firma prospektüsüne uygun olarak 1/100 oranında sulandırılarak im-

munohistokimyasal boyama prosedürü uygulandı. Etüvde bütün gece 37°C derecede bırakılan kesitler ertesi gün 60°C derecede 60 dakika bekletildi. 15 dakika ksilende, 15 dakika absolü alkolde bırakılan kesitler 5 dakika PBS (phosphate buffer saline) ile yıkandı. Ardından 1/10 oranında distile su ile sulandırılan antiijen retrieveal (sitrat buffer) solusyonu içinde mikrodalgada sırasıyla 750, 750, 650 ve 500 wattta 5'er dakika bekletildi. 25 dakikada oda ısısına gelen kesitler PBS ile 5 dakika yıkandı 10 dakika %3'lük hidrojen peroksit ile nemli ortamda inkübe edildi. PBS ile yıkandıktan sonra 5 dakika ultra V blok ile nemli ortamda inkübe edildi. Ardından kesitlere PTEN antikoru uygulanarak nemli ortamda 60 dakika inkübe edildi. PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı ve HRP-AEC yöntemi ile rutin boyama işlemi tamamlandı. Pozitif kontrol için kesitlerdeki lenfositler ve periferik sinir kesitleri kullanıldı. PTEN boyanma paterni değerlendirilirken Zheng HC ve arkadaşlarının yöntemi esas alındı (15). PTEN reaktivitesini yaygınlık ve dağılımı semikantitatif bir skorlama sistemi kullanılarak nükleer tipteki boyanma değerlendirildi. Her bir kesitte boyanmanın görüldüğü alanlardan rastgele seçilen 5 alanda 100 hücre sayılarak; %25-50 ve üzeri kuvvetli boyanma (+++), %5-25 orta derecede boyanma (++), %5'in altındaki boyanmalar hafif derecede boyanma (+) ve hiç boyanma olmaması negatif boyanma (-) olarak değerlendirildi.

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 10.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi kullanıldı. Parametreler arasındaki ilişkinin incelenmesinde Spearman korelasyon testinden yararlandı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışma Dr.Lütfi kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji bölümünde; yaşları 35 ile 80 arasında değişen, 18'i kadın (%30.0) ve 42'si erkek (%70.0) toplam 60 olgu üzerinde yapılmıştır. Olguların ortalama yaşı 59.50 ± 12.10 'dur.

PTEN ekspresyonu ile olguların yaş ortalamaları ve

Tablo 1: Demografik özellikler

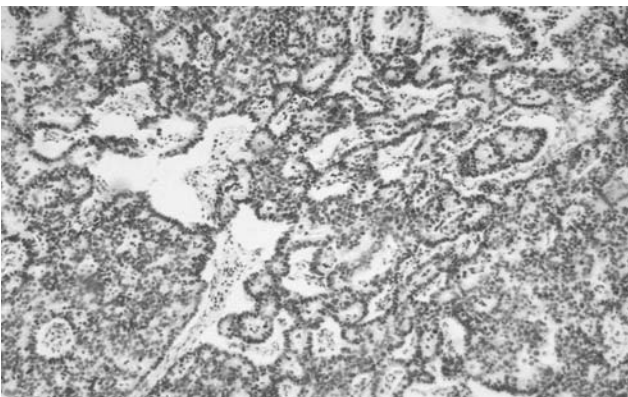
Demografik özellikler	PTEN ekspresyonu								p
	-		+		++		+++		
Yaş	58.85+12.10		55.87+12.36		60.81+11.51		62.73+13.21		0.464
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Cinsiyet									0.296
Erkek	8	19.0	13	31.0	15	35.7	6	14.3	
Kadın	5	27.8	2	11.1	6	33.3	5	27.8	

p<0.05: anlamlı

Tablo 2: PTEN Ekspresyonunun prognostik parametrelerle karşılaştırılması

	PTEN ekspresyonu								p
	-		+		++		+++		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Lauren sınıflaması									0.001**
İntestinal	2	5.9	7	20.6	15	44.1	10	29.4	
Diffüz	9	64.3	4	28,6	1	7,1	-	-	
Mikst	2	16.7	4	33.3	5	41.7	1	8.3	
Histolojik grade									0.001**
Az	11	39.3	9	32.1	7	25.0	1	3.6	
Orta-iyi	2	6.3	6	18.8	14	43.8	10	31.3	
Vasküler invazyon									0.274
Var	9	19.1	12	25.5	19	40.4	7	14.9	
Yok	4	30.8	3	23.1	2	15.4	4	30.8	
Perinöral invazyon									0.267
Var	11	20.4	12	22.2	20	37.0	11	20.4	
Yok	2	33,3	3	50,0	1	16,7	-	-	
Lenf nodu metastazi									0.485
Var	11	22.4	11	22.4	19	38.8	8	16.3	
Yok	2	18.2	4	36.4	2	18.2	3	27.3	
TNM									0.892
Evre I	1	20.0	1	20.0	1	20.0	2	40.0	
Evre II	2	16.7	3	25.0	4	33.3	3	25.0	
Evre III	8	22.9	8	22.9	13	37.1	6	17.1	
Evre IV	2	25.0	3	37.5	3	37.5	-	-	

**p<0.01 ileri düzeyde anlamlı

**Resim 1: İntestinal tip, iyi diferansiye gastrik adenokarsinom olgusunda kuvvetli PTEN nükleer boyanması (PTENx100)**

cinsiyet dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 1).

PTEN ekspresyonu ile Lauren sınıflaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmaktadır ($p<0.01$) (Tablo 2). Tümörlerin Lauren sınıflamasına göre PTEN ekspresyonları; intestinal tipte %94.1, mikst tipte %83.3 ve diffüz tipte ise %35.7 olarak bulunmuştur.

PTEN ekspresyonu ile histolojik grade arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmaktadır ($p<0.01$) (Tablo 2). Tümörlerin histolojik grade'lerine göre PTEN ekspresyonları; orta ve iyi diferansiye tümörlerde %93.7 iken az diferansiye tümörlerde %60.7 olarak bulunmuştur (Resim 1).

PTEN ekspresyonu ile vasküler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu metastazı, TNM evre arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 2).

TARTIŞMA

Son yıllarda gastrik karsinomların insidansında azalma olmasına rağmen halen tüm dünyada ölüme neden olan karsinomlar arasında ikinci sıklıkta yer almaktadır (20-22).

Prognostik faktörlerin; tümör tedavisini yönlendirilmesi, nüks, metastaz ihtimallerinin değerlendirilmesi ve sağ kalım üzerine etkileri bilinmektedir. Hasta ve tümörle ilgili pekçok prognostik faktör bir arada ve birbirleriyle etkileşerek; klinik gidiş ve sağ kalımda önemli rol oynamaktadır. Bilinen prognostik faktörlerin hiçbiri tek başına etkili değildir (20-22).

Gastrik karsinomlarda prognostik faktörler pekçok genetik, biyolojik ve histolojik araştırmalarla ortaya konmuştur. Son yıllarda gelişen moleküler biyolojik çalışmalar sonucunda; tümör supresör genler, kromozomal değişiklikler ve proliferasyon markerlarının prognostik önemi hakkında çok sayıda yeni bilgiler elde edilmiştir (20-22).

Bu çalışmalar sonucunda; karsinomlarda çok sayıda genetik değişiklikler tespit edilmiştir. Bu değişikliklerin başında protoonkogenlerin aktivasyonu ve tümör supresör genlerin inaktivasyonu gelir. Şimdiye kadar tespit edilmiş en sık tek gen değişikliği p53 gen değişikliğidir. Son yıllarda 10.kromozomda yerleşmiş bir tümör supresör gen olarak belirlenen PTEN'in pekçok karsinomda tümörigenez ve progresyonda rolü araştırılmıştır (1-4,12-19).

PTEN proteinindeki mutasyon veya anormal ekspresyonlar birçok tümörde araştırılmış olup tümörigenez ve progresyonla anlamlı ilişkiler bulunmuştur. Gastrik karsinomlarda immunohistokimyasal yöntemle yapılan bazı çalışmalarda PTEN ekspresyonunun histolojik alt tip, diferansiasyon, evre, metastaz, invazyon de-

rinliği gibi prognostik parametrelerle negatif yönde korele olduğu bulunmuştur (13-19).

Ling Yang ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada gastrik karsinomların Lauren sınıflamasına göre PTEN ekspresyonlarını karşılaştırmışlar, diffuz tip karsinomların intestinal tip karsinoma oranla daha az oranda PTEN eksprese ettiklerini saptamışlardır. Ayrıca tümörlerin diferansiasyonlarına göre PTEN ekspresyonlarını da incelemişler ve az diferansiye karsinomların orta ve iyi diferansiye karsinoma göre daha az PTEN eksprese ettiklerini bildirmişlerdir. Lenf nodu tutulumu olan olgularda olmayanlara göre PTEN ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptamışlardır (13).

Hua-Chuan Zeng ve arkadaşlarının yaptıkları iki ayrı çalışmada; tümörlerdeki invazyon derinliği, metastaz, büyüme paterni, Lauren sınıflaması ve histolojik sınıflandırma ile PTEN ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulmuşlar, ayrıca tümör boyutları, Bormann sınıflaması ve TNM evre ile korelasyon bildirmişlerdir (14,15). Biz de PTEN ekspresyonu ile tümörlerin Lauren sınıflaması ve histolojik grade arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptadık ($p<0.01$).

Young-Hwa Kang ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada mide karsinomlarında; invazyon derinliği, tümör boyutları, lenf nodu metastazı, lenfatik invazyon ve TNM evre ile anlamlı ilişki bulmuşlar, uzak organ metastazı ve vasküler invazyon ile korelasyon saptamamışlardır (17). Mee Sook Roh ise primer akciğer karsinomlarında yaptığı bir çalışmada PTEN ekspresyonu ve evre ile lenf nodu tutulumu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptamamıştır (2). Bizim çalışmamızda, PTEN ekspresyonu ile lenf nodu metastazı, vasküler invazyon ve perinöral invazyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir. Ayrıca PTEN ekspresyonu ile TNM evresi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki de bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 2).

Bu sonuçlar göz önüne alındığında gastrik karsinomlarda PTEN ekspresyonu; malign transformasyon ve prognostik açıdan anlamlı olmakla birlikte bu konuda daha geniş serili araştırmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Zhou XP, Gimm O, Hampel H, et al: Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation. *Am J Pathol.* 2000; 157: 1123-1128
2. Roh MS: Loss of PTEN expression in primary lung cancer. *The Korean J Pathol.* 2002; 36: 286-291
3. Li J, Yen C, Liaw D, et al: PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 1997; 28: 275 (5308): 1943-1947.
4. Kimura F, Watanabe J, Hata H, et al: PTEN immunohistochemical expression is suppressed in G1 endometrioid adenocarcinoma of the uterine corpus. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003; 20
5. Chung MJ, Jung SH, Lee BJ: Inactivation of the PTEN gene protein product is associated with the invasiveness and metastasis, but not angiogenesis, of breast cancer. *Pathol Int* 2004; 54: 10-15.
6. Sano T, Lin H, Chen X, et al: Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis. *Cancer Res.* 1999; 15; 59 (8): 1820-1824.
7. Perren A, Weng LP, Boag AH, et al: Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *Am J Pathol.* 1999; 155 (4): 1253-1260.
8. McMenamin ME, Soung P, Perara S, et al: Loss of PTEN expression in paraffine-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res* 1999; 59: 4291-4296.
9. Kondo K, Yao M, Kobayashi K, et al: PTEN / MMAC1 / TEP1 mutations in human primary renal cell carcinoma and renal cell carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 2001 15; 91 (2): 219-224.
10. Aveyard JS, Skilleter A, Habuchi T, Knowles MA: Somatic mutation of PTEN in bladder carcinoma. *Br J Cancer.* 1999; 80 (5-6): 904-908.
11. Çelebi JT, Ping XL, Zhang H, et al: Germline PTEN mutations in three families with Cowden syndrome. *Exper Dermatol.* 2000; 9: 152-156.
12. Marsh DJ, Dahia PL, Zheng Z, et al: Germline mutations in PTEN are present in Bannayan Zonana Syndrome. *Nat Genet* 1997 16 (4): 333-334.
13. Yang L, Kuang LG, Zheng HC, et al: PTEN encoding product: a marker for tumorogenesis and progression of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9 (1): 35-39.
14. Zheng HC, Li YL, Sun JM, et al: Growth, invasion, metastasis, differentiation, angiogenesis and apoptosis of gastric cancer regulated by expression of PTEN encoding products. *World J Gastroenterol* 2003; 9 (8): 1662-1666.
15. Zheng HC, Sun JM, Li XF, et al: Role of PTEN and MMP-7 expression in growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma. *Pathol Int* 2003; 53: 659-666.
16. Byun DS, Cho K, Ryu BK, et al: Frequent monoallelic deletion of PTEN and its reciprocal association with PIK3CA amplification in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 104: 318-327.
17. Kang YH, Lee HS, Kim WH: Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma. *Lab Inv* 2002; 82; 3: 285-291.
18. Wang JY, Huang TJ, Chen FM, et al: Mutation analysis of the putative tumor suppressor gen PTEN / MMAC1 in advanced gastric carcinomas. *Virchow's Arch* 2003; 442: 437-443.
19. Sato K, Tamura G, Tsuchiya T, et al: Analysis of genetic and epigenetic alterations of the PTEN gene in gastric cancer. *Virchows Arch* 2002; 440: 160-165.
20. Rosai J: *Gastrointestinal Tract, Chapter 11.in: Ackerman's Surgical Pathology, ed. Rosai J, St Louis Mosby, 1996: 616-667.*
21. St Owen AD: *The Stomach, Chapter 32 in: Diagnostik Surgical Pathology, ed. Mills SE, Lippincott Williams and Wilkins, 2004: 1435-1475.*
22. Campbell F, Bogomoletz WV, Williams GT: *Tumors of the Esophagus/Stomach, Chapter 8.in: Diagnostik Histopathology of Tumors, ed. Fletcher CDM, Churchill Livingstone, 2000: 313-369.*