T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ
ANABİLİM DALI

PROSTAT ADENOKARSİNOMLARINDA MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN YOLAĞININ PROGNOZA ETKİSİ

NİLHAN AKBULUT

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2015

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ
ANABİLİM DALI

PROSTAT ADENOKARSİNOMLARINDA MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN YOLAĞININ PROGNOZA ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

NİLHAN AKBULUT

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

Prof. Dr. KUTSAL YÖRÜKOĞLU

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı tarafından desteklenmiştir.
BAP Proje no: 2014.KB.SAG.013

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ V

ŞEKİL LİSTESİ V

RESİM LİSTESİ V

KISALTMALAR VI

TEŞEKKÜR 1

ÖZET 2

İNGİLİZCE ÖZET 4

GİRİŞ VE AMAÇ **6**

1. GENEL BİLGİLER 7

1.1. EPİDEMİYOLOJİ 7

1.1.1. Coğrafik Dağılım 7

1.1.2. Yaş Dağılımı 7

1.2. ETYOLOJİ VE PATOGENEZ 7

1.3. LOKALİZASYON 9

1.4. KLİNİK BULGULAR 9

1.5. LABORATUVAR TESTLERİ 9

1.5.1. Prostat spesifik antijen (PSA) 9

1.5.2. Serum total PSA ve yaşa özgü referans aralıkları 10

1.5.3. Serbest PSA 10

1.5.4. Kompleks PSA 10

1.5.5. PSA dansitesi (PSAD) 11

1.6. PROSTAT EPİTELİYAL TÜMÖRLERİNİN SINIFLAMASI 11

1.7.PROSTAT ADENOKARSİNOMLARINDA PROGNOSTİK FAKTÖRLER 12

1.7.1. Serum PSA düzeyi 13

1.7.2. Patolojik evre 13

1.7.3. Mikroskopik dereceleme 14
1.7.4. Cerrahi sınırlar 17
1.7.5. Tümör hacmi 17
1.7.6. DNA ploidi 17
1.7.7. Perinöral invazyon 18
1.7.8. Nöroendokrin değişiklikler 18
1.7.9. Lenfovaskuler invazyon 18
1.7.10. Mikrodamar dansitesi 19
1.7.11. Androjen reseptörü (AR) 19
1.7.12. Proliferasyon indeksi 19
1.7.13. PSA ve PAP'ın immunhistokimyasal olarak gösterilmesi 20
1.7.14. Kromozomal anormallikler 20
1.7.15. P53 ekspresyonu 20
1.7.16. RAS onkogeni 20
1.7.17. Bcl-2 20
1.7.18. Dolaşan tümör hücreleri 20
1.7.19. Diğer moleküler genetik belirleyiciler 20
1.8. PI3K/AKT/mTOR YOLAĞI 21
1.9. PI3K/PTEN/AKT YOLAĞI 22
1.10. STATHMİN-1 24
1.11. SİTOKROM P450-4Z1 (CYP4Z1) 25
1.12. E-CADHERİN 25
1.13. HEY2 26
2. GEREÇ VE YÖNTEM 27
2.1. GENEL BİLGİLER 27
2.2. İMMUNHİSTOKİMYASAL İNCELEME 28

2.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME 34

3. BULGULAR 35

3.1. PATOLOJİK VE KLİNİK BULGULAR 35

3.2. İMMUNHİSTOKİMYASAL BULGULAR 35

4. TARTIŞMA 39

5. SONUÇLAR 43

6. KAYNAKLAR 44

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Kullanılan primer antikorlara ait bilgiler

Tablo2: İmmunhistokimyasal belirleyicilerin Cox regresyon modeline göre biyokimyasal nuks etkisi

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Şematik mTOR/PTEN/PI3K/AKT yolağı

Şekil 2: mTOR yolağının PI3K/Akt sinyali ile ilişkili inhibisyonu ve FGF2'nin indüklediği E-cadherin inhibisyonu

Şekil 3: PI3K ve Hey2 ilişkisi şematik anlatım

RESİM LİSTESİ

Resim 1: İmmünohistokimya çalışılması için hazırlanan TMA bloklar

Resim 2: mTOR, pozitif ve negatif boyanma örnekleri, x20

Resim 3: PI3K, pozitif ve negatif boyanma örnekleri, x40

Resim 4: AKT, pozitif ve negatif boyanma örnekleri, x20

Resim 5: 4EBP1, pozitif ve negatif boyanma örnekleri, x20

Resim 6: p70S6K, pozitif ve negatif boyanma örnekleri, x20

Resim 7: PTEN, pozitif ve negatif boyanma örnekleri, x20

Resim 8: Stathmin-1, pozitif ve negatif boyanma örnekleri, x20

Resim 9: CYP4Z1, pozitif ve negatif boyanma örnekleri, x20

Resim 10: E-cadherin, pozitif ve negatif boyanma örnekleri, x20

Resim 11: Hey2, pozitif ve negatif boyanma örnekleri, x20

KISALTMALAR

mTOR: Mammalian target of rapamycin

H&E: Hematoksilen & Eozin

PSA: Prostat spesifik antijen

DHT: Dihidrotestosteron

AR: Androjen reseptörü

IGF : İnsülin benzeri büyüme faktörü

TURP: Transüretral rezeksiyon

BPH: Benign prostat hiperplazisi

ACT : α-1-antikemotripsin

PSAD: PSA dansitesi

PIN: Prostatik intraepitelyal neoplazi

CAP: Collage of American pathologists

ISUP: The International Society of Urologic Pathology

VEGF: Vaskuler endotelyal growth faktör

PAP: Prostatik asit fosfataz

PI3K: Fosfoinositide 3-kinase

PIP2: Fosfatidil inositol 4,5 bifosfat

PIP3: Fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfat

CTMP: Karboksi-terminal modülatör protein

PDK1: Fosfoinositid bağımlı protein kinaz 1

HIF-1α: Hipoksi inducible faktör-1α

PTEN: Fosfotaz ve tensin homolog

MAB: Maksimal androjen blokajı

HER2/3: İnsan epidermal büyüme faktörü 2 ve 3

CYP 4Z1: Sitokrom P450-4Z1

FGF: Fibroblast growth faktör

TMA: Doku mikroaray

SPSS: Statistical Packace For the Social Sciences

TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık tezimin hazırlanmasındaki danışmanlığı ve katkıları nedeniyle başta Prof. Dr. Kutsal Yörükoğlu'na,

Klinik verileri ve hasta listesini oluşturmadaki katkıları için Dokuz Eylül Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı tıpta uzmanlık öğrencisi Dr. Sedat Karakoç'a,

Elde edilen verilerin istatistiksel analizinin yapılmasındaki katkıları için Doç. Dr. Sarp Üner'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca sağladıkları katkılar nedeniyle Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Başkanlığı, öğretim üyeleri, tıpta uzmanlık öğrencileri ve tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Dr. Nilhan AKBULUT
İzmir-2015

ÖZET

PROSTAT ADENOKARSİNOMLARINDA MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN YOLAĞININ PROGNOZA ETKİSİ

Dr. Nilhan Akbulut

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

nilhanakbulut@gmail.com

Amaç: Prostat kanseri dünyada en sık görülen kanserlerden biridir ve insidansı hızla artmaktadır. Bir grup hasta yalnızca aktif izlemle yönetilebilirken bir grup hasta agresif bir seyir göstermektedir. Şu anda, özel sinyal yolları ve immünoterapi hedefleyen çeşitli yeni tedavi stratejileri prostat kanseri için araştırılmaktadır. Son zamanlarda yapılan araştırmalar mammalian target of rapamycin (mTOR) yolunun tedavi için bir hedef olabileceğini göstermiştir. Deneysel ve klinik çalışmalarda, mTOR inhibitörlerinin çeşitli kanser türlerinde büyümeyi engelleyici ve anti-anjiogenik özellikleri olduğu gösterilmiştir. Ancak, mTOR yolunun değişiklikleri prostat kanserli hastalarda çok iyi araştırılmamıştır. Bu çalışma ile çeşitli tümörlerde moleküler olarak tanımlanan ve prognoz ile ilişkisi saptanan mTOR sinyal yolağı proteinleri (AKT, p-mTOR, 4E-BP1, p-P70S6K, PIK3CA) ve bu yolağı etkileyen çeşitli proteinlerin (PTEN, Stathmin-1, Cyp4z1, E-cadherin, Hey2) immunohistokimyasal yöntemle çalışılıp sonuçlarının prostat karsinomlarındaki patolojik prognostik parametreler ve biyokimyasal nüks ile ilişkisinin araştırılması planlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 2003-2013 yılları arasında DEÜTF Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda "Prostat Karsinomu" tanısı alan 389 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Olgulara ait hazır Hematoksilen & Eozin (H&E) boyalı preparatlardan seçilen tümörlü alanlar parafin bloklar üzerine işaretlenerek doku mikroarray kalıplarına yerleştirilmiştir. Hazırlanan mikroarray bloklarından yapılan kesitlere p-mTOR, PIK3CA, AKT1, p-P70S6kinaz, 4E-BP1, Anti-PTEN, Stathmin-1, Cyp4z1, E-cadherin, Hey2 immunhistokimyasal boyamaları uygulanmıştır. Boyanma olmaması 0, %0-10 arası tümör hücresinde boyanma olması 1, %10-50 arası tümör hücresinde boyanma olması 2, %50'den fazla tümör hücresinde boyanma olması 3 puan olarak değerlendirilmiştir. Tümör hücrelerindeki zayıf boyanma yoğunluğu (+) 1, orta boyanma yoğunluğu (++) 2, güçlü boyanma yoğunluğu (+++) 3 puan olarak kabul

edilmiştir. İmmunreaktivite skoru ve boyanma yoğunluk skoru birbiri ile çarpılarak 0-9 arası toplam boyanma skoru elde edilmiştir. Elde edilen toplam boyanma skoru kendi içinde gruplandırılmış olup 0-3 arası skoru olanlar zayıf ekspresyon (negatif boyanma), 4-9 arası olanlar güçlü ekspresyon (pozitif boyanma) olarak kabul edilmiştir. Elde edilen immunhistokimyasal bulguların prognostik verilere etkileri istatistiksel olarak araştırılmıştır. Analizlerde sürekli değişkenler için bağımsız grup T testi, süreksiz değişkenler için de Pearson ki-kare testi uygulanmıştır. Tüm testler iki yönlü olup ve $p \leq 0.05$ değerleri anlamlı olarak değerlendirilmiştir. Bağımsız değişkenlerin biyokimyasal nüks ile ilişkisi Cox regresyon modeli ile değerlendirilmiştir (%95 güven aralığı).

Bulgular: Gleason skoru, cerrahi sınır pozitifliği, pT evresi ve tümör hacmi biyokimyasal nüksü belirlemede istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tersiyer patern, vaskuler invazyon, perinöral invazyon ve lenf nodu tutulumu ile biyokimyasal nüks arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. p-P70S6K ve PTEN ekspresyonu ile Gleason skoru ve pT evresi arasında, Stathmin-1 ekspresyonu ile Gleason skoru ve perinöral invazyon arasında istatistiksel anlamlılık saptanmıştır. AKT pozitifliğinin negatifliğine göre biyokimyasal nüks riskini 0,357 kat (%64,3) azalttığı ve istatistiksel olarak da anlamlı olduğu saptanmıştır.

Sonuç: Çalışmamızda biyokimyasal nüks ile patolojik prognostik parametrelerden Gleason skoru, cerrahi sınır pozitifliği, pT evresi ve tümör hacmi ile anlamlı ilişki saptanırken tersiyer patern, vaskuler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu tutulumu ile anlamlı ilişki saptanmadı. mTOR yolağında etkileri olan proteinlerden p-P70S6K, PTEN ve Stathmin-1 ile prognostik değeri yüksek iki parametre olan Gleason skoru ve pT evresi arasında anlamlı ilişki saptandığından doğrudan biyokimyasal nüksü belirleyen AKT ekspresyonu ile birlikte bu proteinlerin prostat kanserinde prognostik değerleri olabileceği düşünüldü.

Anahtar kelimeler: Prostat, mTOR, 4E-BP1, p-P70S6kinaz, PIK3CA, AKT1, PTEN, E-cadherin, Cyp4z1, Stathmin-1, Hey2

ABSTRACT

PROGNOSTIC EFFECT OF MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN PATHWAY IN PROSTATE ADENOCARCINOMA

Nilhan Akbulut, MD

Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine, Department of Pathology

nilhanakbulut@gmail.com

Aim: Prostate cancer is the most frequent type of cancer in the world and it's incidence is increasing. Even though this cancer can be managed by active surveillance for a group of patients, it is not a proper way for other group of patients that show more aggressive features. Many researches conduct to find out for new treatment methods based on immunotherapy. Recent researches show that mammalian target of rapamycin (mTOR) cascade may be an alternative for prostate cancer's treatment. Experimental and clinical studies shows that mTOR inhibitors have anti-angiogenic and growth inhibitory characteristic on several types of cancer. However, the studies on mTOR pathway changes for prostate cancer patients have not been detailed. In this study, mTOR signaling pathway proteins (AKT, p-mTOR, 4E-BP1, p-P70S6K, PIK3CA) and several proteins that affect this pathway (PTEN, Stathmin-1, Cyp4z1, E-cadherin, Hey2) were studied by immunohistochemistry. Immunohistochemical data were compared with pathologic prognostic parameters and biochemical recurrence.

Material& method: 389 prostate carcinoma patients were included in the study diagnose between 2003 and 2013. Tissue micro-array blocks were prepared from tumor areas. AKT, p-mTOR, 4E-BP1, p-P70S6K, PTEN, Stathmin-1, Cyp4z1, E-cadherin, Hey2 immunhistochemical stains were applied to the sections prepared from these blocks. Staining extent of >0% but <10% was graded as 1, ≥10% but <50% as 2, and ≥50% as 3. Weak intensity of staining was graded as 1, moderate intensity as 2, and strong intensity as 3. Immunoreactivity score and staining intensity scores were multiplied by each other. Final staining scores of 0-9 were obtained. Total staining scores were grouped. 0-3 score was considered weak expression (negative staining). 4-9 score was considered strong expression (positive staining). Immunhistochemical results were statistically compared with prognostic parameters. In the analysis, Independent groups t test for continuous variables, Pearson's chi-

square test for discontinuous variables were applied. Statistical significance in this study was set at P≤0.05. Correlation of immunostaining with biochemical relapse was done using a Cox regression model (%95 confidence interval).

Results: There was statistically significant correlation between Gleason score, surgical margin positivity, pT stage, tumor volume and biochemical recurrence. There was no significant relationship between tertiary pattern, vascular invasion, perineural inasion, lymph node involvement and biochemical recurrence. Statistical significance was found between immunohistochemical score p-P70S6K, PTEN with pT stage and Gleason score. Statistical significance was found between Stathmin-1 and Gleason score and perineural invasion. The results indicate that AKT-1 positivity decreased the risk of biochemical recurrence (x0.357, 64.3%) statistically.

Conclusion: In our study, statistically there was a significant relation between the biochemical recurrence with Gleason score, surgical margin positivity, pT stage and tumor volume. However, there was no significant relation between the biochemical recurrence with tertiary pattern, vasculary invasion, perineural invasion, lymph node involvement. Since there was statistically significant relationship between two prognostic parameters Gleason score and pT stage, with proteins p-P70S6K, PTEN and Stathmin-1 which have impact on mTOR pathway, these proteins and AKT expression that was found to be related with biochemical recurrence are suggested to have prognostic impact on prostate carcinoma.

Key words: Prostate, mTOR, 4E-BP1, p-P70S6kinaz, PIK3CA, AKT1, PTEN, E-cadherin, Cyp4z1, Stathmin-1, Hey2

GİRİŞ VE AMAÇ

Prostat kanseri dünyada en sık görülen kanserlerden biridir ve insidansı hızla artmaktadır. Prostat kanseri riski 50 yaşına dek düşükken yaşla birlikte giderek artar. Dünya çapında, tüm olguların yaklaşık dörtte üçü 65 yaş ve üzeri erkeklerde görülür. Histolojik olarak en sık adenokarsinom formunda izlenir. Farklı derecelerde diferansiyasyon gösteren küçük asiner, büyük asiner, kribriform, solid/trabeküler tipler görülebilir.

Prostat karsinomlu bir grup hasta yalnızca aktif izlemle yönetilebilirken bir grup hasta agresif bir seyir göstermektedir. Şu anda, özel sinyal yolları ve immünoterapi hedefleyen çeşitli yeni tedavi stratejileri prostat kanseri için araştırılmaktadır.

Son zamanlarda yapılan araştırmalar mammalian target of rapamycin (mTOR) yolunun kanser tedavisi için çekici bir hedef olduğunu bulmuştur. Deneysel ve klinik çalışmalarda, mTOR inhibitörlerinin çeşitli kanser türlerinde büyümeyi engelleyici ve anti-anjiogenik özellikleri olduğu gösterilmiştir. Bu bakış açısıyla mTOR prostat kanserinde de tedavi için önemli bir moleküler hedef olabilir. Ancak, mTOR yolunun değişiklikleri prostat kanserli hastalarda çok iyi araştırılmamıştır.

Bu çalışma ile çeşitli tümörlerde moleküler olarak tanımlanan ve prognoz ile ilişkisi saptanan PI3K/AKT /mTOR sinyal yolağı (AKT, p-mTOR, 4E-BP1, p-P70S6K) ve bu yolağı etkileyen çeşitli proteinlerin (PTEN, Stathmin-1, Cyp4z1, E-cadherin, Hey2) immunohistokimyasal yöntemle çalışılıp sonuçlarının prostat karsinomlarındaki patolojik prognostik parametreler (Gleason skoru, pT evresi, cerrahi sınır, lenf nodu tutulumu, tümör hacmi, perinöral invazyon, vaskuler invazyon, tersiyer patern) ve biyokimyasal nüks (PSA düzeyi) ile ilişkisinin araştırılması planlanmıştır.

Etik Kurul Kararı

Çalışmamız, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından, 07.11.2013 tarih ve 2013/40-09 karar numarası ile onaylanmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. EPİDEMİYOLOJİ

1.1.1. Coğrafik dağılım

Prostat kanseri dünyada en sık görülen altıncı kanser olup erkeklerde üçüncü en sık kanserdir. Olguların tahmini sayısı 2000 yılında 513.000'dir. Bu sayı erkeklerdeki kanser olgularının %9,7'sini (gelişmiş ülkelerde %15,3, gelişmekte olan ülkelerde %4,3) temsil etmektedir. Kansere bağlı ölümlerin erkeklerde %5,6 sını, tüm kanser ölümlerinin de %3,2'sini oluşturmaktadır. Bu düşük ölüm oranı prostat kanseri tanısı almış birçok erkeğin hayatta olduğu anlamına gelir ki 2000 yılında 5 yılda 1,5 milyon olgu ile erkeklerde en yaygın kanser tipidir. Son yıllardaki insidans oranları yalnızca hastalık riski farklılıklarını değil aynı zamanda latent kanserlerin tanısında hem asemptomatik bireyleri tarama, hem de otopsi ve prostatektomi operasyonları sırasında çıkarılan doku içinde gizli kalmış kanserlerin tespiti ile ortaya çıkan oranları da yansıtır. Böylece taramanın yaygın olduğu ülkelerde (A.B.D, Avustralya, İskandinav ülkeleri) kaydedilen insidans çok yüksek olabilir. Avrupa'da insidans oranları oldukça değişkendir. Kuzey ve batı Avrupa ülkelerinde insidans yüksek iken, güney ve doğu Avrupa ülkelerinde düşük olma eğilimindedir. Prostat kanseri Asya popülasyonlarında nispeten nadirdir. Mortalite, asemptomatik kanserlerin erken tanısından daha az etkilenir. Ancak sağkalım yanı sıra insidansa da bağlıdır. Sağkalım, insidansı yüksek olan ülkelerde (ABD'de % 80, gelişmekte olan ülkelerde % 40) önemli ölçüde daha fazladır. Bu iyi prognoz, tarama prosedürleri ile tespit edilen latent kanserler nedeniyle olabilir. Mortalite oranları Kuzey Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa, Avustralya/Yeni Zellanda, Güney Amerika, Karayipler ve Sahra altı Afrika'da yüksekken Asya ve Kuzey Afrika'da düşüktür [1, 2].

1.1.2. Yaş dağılımı

Prostat kanseri riski 50 yaşına dek düşükken yaşla birlikte giderek artar. Dünya çapında, tüm olguların yaklaşık dörtte üçü 65 yaş ve üzeri erkeklerde görülür [1].

1.2. ETYOLOJİ VE PATOGENEZ

Prostat kanseri sıklığında etnik kökene bağlı belirgin farklılık olması bu farklılıkların en azından bir kısmından genetik faktörlerin sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca

oranların zamana ve göçe bağlı olarak değişmesi çevresel faktörlerin de önemli olduğuna işaret etmektedir. Yapılan kapsamlı çalışmalara rağmen prostat kanserinin çevresel risk faktörleri iyi anlaşılamamıştır.

Yapılan çalışmalarda fazla kalori alımı, yağdan zengin diyet, hayvansal ürün tüketimi prostat karsinomu ile ilişkili bulunmuştur. Meyve ve sebze tüketiminin prostat kanserinden koruyucu olduğuna dair ikna edici kanıtlar yoktur [1].

Birinci derece bir akrabada prostat kanseri öyküsü riski iki kat, birinci derece iki veya üç akrabada prostat kanseri öyküsü ise 11 kat arttırır. Aile öyküsü olan erkeklerde gözlenen ırksal farklılıklar ve yüksek risk genetik faktörlerin hastalıkta önemli rolü olduğunu göstermektedir. Ailesel kanserin klinik ve patolojik bulguları ailesel olmayan ile aynıdır [1, 3].

Erkek seks hormonları prostat kanserlerinin gelişiminde ve büyümesinde önemli bir rol oynamaktadır. Prostat kanseri puberte öncesi kastrasyon yapılanlarda görülmez. Bununla birlikte karaciğer sirozuna bağlı hiperöstrojenizmli hastalarda sıklığı azdır [4].

Testosteron, steroid 5-alfa redüktaz tip II enzimi ile daha aktif formu olan dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülür ve bez içine yayılır. DHT ve testosteron, androjen reseptörüne (AR) bağlanır. Bu reseptör/ligand kompleksi nukleusa hareket eder ve hücre bölünmesini kontrol eden androjen cevaplı genleri aktive eder. Çoğu araştırma bu düzenleyici genlerdeki polimorfizmlerin prostat kanseri gelişimindeki etnik varyasyonları açıklayabilmedeki rolü üzerinde durmaktadır. SRD5A2 genlerindeki polimorfizmler bu rolün küçük bir kısmını açıklayabilir ancak X kromozomunun uzun kolu üzerinde bulunan AR geni daha fazla ilgi çekmektedir. AR geni oldukça polimorfik bir bölge olan ekzon 1'de bulunan CAG tekrarları içermektedir. Normal aralık 6-39 tekrardır. Çeşitli çalışmalar AR genindeki CAG tekrar uzunlukları daha az sayıda olan erkeklerin prostat kanseri için daha yüksek risk altında olduğunu göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde siyahlarda beyazlara oranla daha az CAG tekrarı vardır, bu da prostat kanseri duyarlılıklarını açıklamaktadır [1].

Vitamin D reseptör genindeki ya da insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) sinyal yolundaki polimorfizmler prostat kanseri riski ile ilişkili olabilecek diğer genetik mekanizmalar olarak öne sürülmüştür. Ancak bu sistemlerde bir etnik farklılık olduğuna dair hiç bir kanıt yoktur [1].

Diğer çevresel faktörler (mesleki maruziyet) veya davranışsal faktörler (cinsel yaşam) de araştırılmıştır ancak net bir rol oynadığı gösterilememiştir [1].

1.3. LOKALİZASYON

İğne biyopsi ile tanı alan klinik olarak palpabl çoğu prostat kanseri baskın olarak posterior ve posterolateral yerleşimlidir [1-3]. Bazı olgularda büyük transizyonel zon tümörleri periferal zona uzanıp palpabl hale gelebilir. Transüretral rezeksiyon (TURP) ile saptanan kanserler baskın olarak transizyonel zonda yerleşmiştir. İğne biyopsi ile tanı alan nonpalpabl kanserlerin yaklaşık %15-25'i de transizyonel zonda yerleşmiş olmasına rağmen baskın olarak periferik zonda bulunmaktadırlar. Büyük tümörler santral zona uzanabilir ama kanserler nadiren bu bölgede ortaya çıkarlar. %85 prostat karsinomu olgusunda adenokarsinom multifokaldir [1].

1.4. KLİNİK BULGULAR

Serum prostat spesifik antijen (PSA) testi sık olarak kullanılmaya başlamadan önce çoğu prostat kanseri asemptomatik olup dijital rektal muayene ile tanı almıştır. PSA taraması ile ortalama tümör hacmi azalmış olup semptomatik olarak başvuran hasta sayısı da düşmüştür. Çoğu kanserler periferik zonda ortaya çıktığından, transizyonel zonda ortaya çıkan hiperplaziler gibi mesane çıkışında tıkanıklığa yol açmazlar. Nadiren büyük tümörler obstrüksiyona yol açabilirler. Pelvik ağrı, rektal kanama ve tıkanıklıkla ortaya çıkabilen lokal yayılan kanserler geçmişe oranla daha az görülmektedir.

Pelvik kemiklere ve spinal korda metastaz yapmış olan prostat adenokarsinomları kemik ağrısına ve spinal kord basısına yol açabilir.

Büyümüş lenf nodları (genellikle pelvik, nadiren supraklavikuler ve aksiller) bazen bir semptom olarak ortaya çıkabilir.

Asit ve plevral efüzyon prostat kanserinin nadir prezentasyonlarıdır [1].

1.5. LABORATUVAR TESTLERİ

1.5.1. Prostat spesifik antijen (PSA):

PSA prostat duktuslarını döşeyen epiteliyal hücrelerde oluşturulur ve doğrudan prostatik duktal sisteme salınır. PSA geni kromozom 19 üzerinde lokalizedir. Bu genin androjen ilişkili transkripsiyonu sonucu 261 aminoasitlik PSA prekürsörü sentezlenir. Bu prekürsör, küçük bir aminoasit terminal parçasının proteolitik serbestleştirilmesi ile aktive edilir. İnaktif proPSA'dan aktif PSA'ya dönüşümde eksojen prostatik proteazlar (ör. hK2, prostin, prostaz, tripsin) rol oynar [1].

Serumda PSA'nın farklı moleküler formları bulunur. PSA'nın küçük bir kısmı serumda serbest halde bulunur [1].

1.5.2. Serum total PSA ve yaşa özgü referans aralıkları:

Serum PSA immunoassay teknikleri ile saptanır. Monoklonal antikorlar, PSA'nın serbest formunu (29kDa), α-1-antikemotripsin (ACT) ile kompleks oluşturan (90kDa) PSA'yı ve total PSA yı saptayabilir şekilde tasarlanmıştır.

Total PSA'nın yaşla iyi korele olduğu bulunmuştur. Bir regresyon modelinde 95. persentildeki PSA değerleri beyaz erkekler için 50 yaş altında <2.5 ng/ml, 60 yaş altında <3.5 ng/ml, 70 yaş altında <4.5 ng/ml, 80 yaş altında <6.5 ng/ml olarak değerlendirilmiştir. Bu PSA değerlerinin tanı stratejilerinde normalin üst sınırı olarak kullanılması önerilmiştir.
PSA, prostat kanseri olan olguların çoğunda 4.0 ng/ml sınırının üzerine çıkmaktadır. Benign prostat hiperplazisi (BPH) gibi benign durumlarda da PSA artışı görülebilmektedir. Prostat kanseri olan erkeklerde kimi zaman da PSA bu değerin altında kalabilmektedir. Bu nedenle serum PSA prostat kanseri için yüksek sensitivite ve spesifiteden yoksundur. Bu sorun birkaç PSA ilişkili endeks hesaplanması ve diğer serum markerları ile kısmen çözülmüştür. PSA testleri tümör nüksü ve tedavi sonrası yanıtı tespit etmede yararlıdır. Nüksü tanımlamak için kullanılan değer tedavi şekline bağlı olarak değişiklik gösterebilir [1].

1.5.3. Serbest PSA:

Kanseri olmayan erkeklerde total PSA'nın büyük kısmı serbest PSA formunda iken malignitesi olan erkeklerde büyük kısmı ACT ile kompleks oluşturmuş şekildedir. Prostat kanseri olan kişilerde total PSA'nın median değeri 7.8 ng/ml, serbest/total PSA oranı %10.5'dir. Bu değerler sırasıyla BPH olan kişilerde 4.3 ng/ml ve %20.8, BPH olmayan kontrol grubunda 1.4 ng/ml ve %23.6'dır. Prostat hacmi 40 cm^3'den düşük olan hastalarda serbest PSA/total PSA oranı prostat kanseri ve BPH olan hastalarda belirgin farklılık gösterirken, prostat hacmi 40 cm^3'den büyük hastalarda anlamlı farklılık saptanmamıştır [1].

1.5.4. Kompleks PSA:

Ölçüm yöntemlerindeki değişkenliklere de bağlı olarak ortaya çıkabilecek serbest/total PSA oranı ölçümlerindeki problemler ve artmış hata payı kompleks PSA ölçümüyle önlenebilir. Kompleks PSA'nın spesifite değeri total PSA ve serbest/total PSA oranından yüksektir.

1.5.5. PSA dansitesi (PSAD):

PSA dansitesi serum total PSA konsantrasyonunun transrektal ultrasonografi ile ölçülen prostat hacmine oranıdır. PSAD değerleri; normal (0.050 ng/ml/cm³ ve altı), orta (0.051-0.099 ng/ml/cm³), patolojik (0.1ng/ml/cm³ ve üzeri) olmak üzere üç kategoriye ayrılır.

Prostat dokusu hacmi başına PSA değeri BPH ve prostat kanseri varlığı, epitelyal hücre oranı ve karsinomun histolojik derecesi ile ilişkilidir [1].

1.6. PROSTAT EPİTELİYAL TÜMÖRLERİNİN SINIFLAMASI [1]:

I- Glanduler neoplaziler

- Adenokarsinom (asiner)
    - Atrofik
    - Psödohiperplastik
    - Foamy
    - Kolloid
    - Signet ring
    - Onkositik
    - Lenfoepitelyoma benzeri
- İğsi hücre diferansiyasyonu gösteren karsinom (karsinosarkom, sarkomatoid karsinom)
- Prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN)
- Prostatik intraepitelyal neoplazi derece III (PIN III)
- Duktal adenokarsinom
    - Kribriform
    - Papiller
    - Solid

II-Ürotelyal tümörler

- Ürotelyal karsinom

III-Skuamöz tümörler

- Adenoskuamöz karsinom
- Skuamöz karsinom

IV-Bazal hücreli tümörler

- Bazal hücreli adenom
- Bazal hücreli karsinom

1.7. PROSTAT ADENOKARSİNOMLARINDA PROGNOSTİK FAKTÖRLER:

Prostat karsinomlu hastaların klinik gidişlerini öngörmek için çok sayıda prognostik parametre tanımlanmıştır.

CAP (Collage of American pathologists), prognostik faktörleri üç kategoride sınıflamıştır [1, 4]:

Kategori I: Prognostik önemi kanıtlanmış ve klinik pratikte faydalı olan faktörler:

- Preoperatif serum PSA düzeyi
- TNM evresi
- Gleason skoru
- Cerrahi sınır pozitifliği

Kategori II: Biyolojik ve klinik olarak kapsamlı çalışmalar yapılmış fakat önemi onaylanmamış faktörler:

- Tümör hacmi
- Histolojik tip
- DNA plöidi

Kategori III: Prognostik önemini saptamak için yeterli çalışma yapılmamış faktörler:

- Perinöral invazyon
- Nöroendokrin diferansiyasyon
- Mikrodamar dansitesi
- Nukleer yuvarlaklaşma
- Kromatin yapısı

- Diğer karyometrik faktörler
- Proliferasyon belirleyicileri
- PSA türevleri
- Diğer faktörler (onkogenler, tümör supresör genler, apoptoz genleri, vb.)

1.7.1. Serum PSA düzeyi:

Serum PSA düzeyi, tümör hacmi, tümör yayılımı ve tedaviye yanıtın indirek göstergesi olarak önemli bir prognostik faktördür ve prostat karsinomunu saptamada anahtar rol oynamaktadır [1, 4]. Tanı anındaki PSA düzeyi prognostik bir göstergedir. Yapılan son çalışmalar yüksek PSA düzeyinin yüksek tümör hacmi ve kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermiştir. Serum PSA düzeyi hafif artmış hastalarda (2-9 ng/ml) bu artışın BPH veya diğer benign lezyonlara bağlı olabileceği düşünülmektedir. Bu hasta grubunda PSA düzeyi ile tümör hacmi ve derecesi arasında anlamlı ilişki olmadığı saptanmıştır. Ayrıca tedavi sonrası serum PSA düzeyi artışı nüks açısından önemli bir göstergedir [1].

1.7.2. Patolojik evre:

Patolojik evre tümör yayılımını gösteren en önemli ve prognozu en doğru gösteren parametredir. Prostat kapsülü, veziküla seminalis ve lenf nodu invazyonu gibi patolojik evreyi belirleyen faktörlerle prognoz arasında ilişki vardır. Prostat kapsülüne tümör invazyonu derecesi ile evre ve hacim ile nüks oranı arasında da güçlü bir ilişki bulunmaktadır [4]. Bunlara ek olarak mikroskopik mesane boynu invazyonu, önemli bir prognostik faktör değildir. Lenf nodu metastazı; multipl ise, makroskopik olarak görülebiliyorsa, hacim olarak büyükse ve ekstrakapsüler yayılıma eşlik ediyorsa prognoz daha kötüdür. Pelvik lokalizasyonda ya da prostat ve seminal veziküller çevresinde metastatik lenf nodu bulunmasının prognoz açısından farkı yoktur [4].

Patolojik evre şöyledir [5]:
m: multipl,
r: nüks,
y: tedavi sonrası değerlendirme için kullanılır.
pT2: Organa sınırlı tümör
pT2a: Tek taraflı ve bir tarafın yarısını ya da daha azını tutan tümör
pT2b: Tek taraflı ve bir tarafın yarısından fazlasını tutan tümör

pT2c: Çift taraflı tümör
pT3: Ekstraprostatik yayılım
pT3a: Ekstraprostatik yayılım ya da mesane boynunun mikroskopik invazyonu
pT3b: Vezikula seminalis invazyonu
pT4: Rektum, levator kası ve/veya pelvik duvar invazyonu

Radikal prostatektomi materyalleri için patolojik olarak T1 sınıflaması yoktur. Apeks dikkatli bir şekilde değerlendirilmelidir çünkü cerrahi sınır burada sık olarak pozitiftir. Apekste tümörün iskelet kası elemanlarının arasında bulunması ekstraprostatik yayılım anlamına gelmez. Apikal ve mesane boynu cerrahi sınırı bir bütün olarak değerlendirilmelidir [5].

1.7.3. Mikroskopik derecelendirme:

Mikroskopik derecelendirme klinik veya patolojik evre ile doğrudan ilişkilidir. 90 yıl önce Broders'ın yaptığı çalışmanın öncülüğünde çok sayıda derecelendirme sistemi geliştirilmiştir. Bu sistemlerin tümü iyi ve az diferansiye tümörleri tanımlamakta başarılı olmuşlardır. Fakat orta derecede diferansiye tümörlerin büyük bir kısmında daha az başarılı olmuşlardır. Gleason derecelendirmesi, prostat karsinomu derecelendirmesine uluslararası bir standart getirmiştir ve bugün dünyada patologların çoğu rutinde bu skorlamayı kullanmaktadır [3]. Gleason skoru kullanılarak yapılan mikroskopik derecelendirme, bağımsız bir prognostik faktördür ve diğer sistemlere göre belirgin olarak üstündür [4].

Gleason derecelendirme sistemi:

Gleason derecelendirme sistemi; Veterans' Administration Cooperative Urological Research Group tarafından, 1960 ile 1975 arasında, 4000'den fazla hasta üzerinde yaptıkları çalışma sonucunda ortaya çıkmıştır [3]. Bu sistem yapısal diferansiyasyon derecesine göre yapılmaktadır. Nükleer atipi kullanılmamaktadır [1]. Nükleer atipiyi de içeren derecelendirme sistemleri vardır. Fakat yapılan çalışmalarda, nükleer atipinin, sadece glandüler diferansiyasyona göre yapılan derecelendirmeye bağımsız prognostik bir bulgu kattığına dair ikna edici bir sonuç yoktur [1, 3].

Gleason derecelendirme sisteminde; azalan diferansiyasyona göre 5 histolojik patern tanımlanmıştır. Normal prostat epitel hücreleri bir lümen çevresinde dizilim gösterirler. Patern 1, 2 ve 3'te tüm bezlerde luminal diferansiyasyon ve epitelyal polarite devam etmektedir. Patern 4'te normal polaritede kayıp vardır. Patern 5'te ise nadir luminal diferansiyasyon

görülür ve polarite hemen tümüyle kaybolmuştur [1]. Baskın olan derece primer patern, baskın olmayan derece ise sekonder patern olarak değerlendirilir ve bu ikisinin toplamından 2 ile 10 arasında değişen toplam histolojik skor elde edilir [1, 3]. Eğer tümör tek bir patern içeriyorsa Gleason skoru bu paternin iki katıdır.

Gleason skoru 2 ve 3 çok istisnai bir durumdur. Çünkü Gleason patern 1 çok nadirdir. Gleason skoru 4 ise göreceli olarak nadirdir. Çünkü patern 2 sıklıkla patern 3 ile karışık olarak bulunur. Gleason skoru 2 ile 4 arasında olan tümörler transisyonel zonu örnekleyen TURP materyallerinde görülebilir. İğne biyopsi materyallerinde Gleason skoru 2-4'ün kullanılmaması gerektiği söylenmektedir. Gleason skoru 6 ve 7 en sık görülen skorlardır ve çalışmaların çoğunda tümörlerin büyük bir kısmını oluşturmaktadır [1].

Gleason patern 1:

Uniform, tek, ayrı ve sıkı paketlenmiş bezlerden oluşan, iyi sınırlı tümör nodülleri Gleason patern 1 olarak derecelendirilir. Bez boşluğu bir bez boyutunu geçmez. Bu patern sıklıkla transizyonel zon kanserlerinde görülür. Gleason patern 1 çok nadirdir ve varlığı tartışmalı bir konudur [1].

Gleason patern 2:

Gleason patern 2'de tümör hala oldukça iyi sınırlıdır. Gleason patern 1'e göre bezler daha gevşek paketler halinde ve daha az uniformdur. Gleason patern 1 ve 2 bezler orta dereceli tümörlere göre daha büyük olma eğilimindedir ve abondan soluk eozinofilik sitoplazmaları vardır. Genellikle transizyonel zonda görülürler ancak bazen periferal zonda da ortaya çıkabilirler [1].

Gleason patern 3:

Gleason patern 3 en sık görülen paterndir. Neoplastik bez boyutu sıklıkla patern 1 ve 2'ye göre daha küçüktür. Bu tümörlerin büyük çoğunluğu, belirgin şekil ve boyut farklılıkları gösteren, sıklıkla anguler şekilli, tek tek bezlerden oluşur. Tümör nonneoplastik prostat asinusları arasına infiltrasyon gösterir. Küçük bezler, patern 3 için tipiktir fakat daha büyük ve düzensiz şekilli bezler de görülebilir. Bütün bezler lümene sahiptir ve stroma tarafından çevrelenirler. Kribriform bezler patern 3'te nadir olarak görülebilir ve kribriform patern gösteren HGPIN'dan ayrımı zordur [1].

Gleason patern 4:

Gleason patern 4 büyük, düzensiz, kribriform ya da lümeni belirsiz, birleşmiş, düzensiz sınırlı bezleri içerir. Birleşmiş bezler stroma tarafından birbirinden ayrılmayan bezler grubundan oluşur. Bezler kümesi içerisinde nadiren çok ince bağ dokusu alanları görülebilir. Kribriform patern 4 bezleri büyük ve düzensiz şekillidir. Birleşmiş bezleri aksine kribriform bezlerin arasında stroma görülmez. Kribriform invaziv karsinomların çoğu patern 3 yerine patern 4 olarak derecelendirilmelidir. Hipernefromatoid patern berrak ya da soluk sitoplazmalı hücrelerden oluşan Gleason patern 4'ün çok nadir görülen bir varyantıdır [1].

Gleason patern 5:

Gleason patern 5'te tümörde glandüler diferansiyasyon kaybı görülür. Stromaya invazyon gösteren solid tabakalar, kordonlar, trabeküller veya tek tek hücrelerden oluşur [1]. Kribriform ya da ortasında komedonekroz içeren solid adalar da patern 5 olarak derecelendirilir.

Tersiyer patern:

İğne biyopsi ve radikal prostatektomi materyallerinde tersiyer patern tanımlaması farklıdır. İğne biyopsilerde tersiyer patern üçüncü sıklıkta görülen paterndir. Radikal prostatektomi materyallerinde ise primer ve sekonder paternlerden daha yüksek dereceli ve toplam tümör hacminin %5'inden azını oluşturan patern olarak tanımlanmaktadır. Prostat karsinomu heterojen bir tümördür. Yaklaşık %5 olguda üç (çok nadiren dört) farklı Gleason paterni bulunmaktadır. Gleason kendi serisinde %50 olgunun iki ve üzeri farklı patern içerdiğini belirtmiştir [3].

The International Society of Urologic Pathology (ISUP), üç ve üzeri farklı patern içeren olgularda, Gleason skorlamasını en sık olan patern ile en kötü paternin toplamı şeklinde modifiye etmişlerdir. Örnek olarak; %60 oranında derece 3, %35 derece 4 ve %5 oranında derece 5 içeren bir radikal prostatektomi materyali ISUP'a göre 3 (en sık patern) + 5 (en kötü patern) = 8 olarak derecelendirilmelidir. Fakat bu materyalin klasik Gleason skoru 3 (en sık patern) + 4 (en sık ikinci patern) = 7 'dir. Bu modifiye Gleason skorlamasının prospektif doğrulama gerektirdiği düşünülmektedir [3].

1.7.4. Cerrahi sınırlar:

Cerrahi sınır pozitifliği radikal prostatektomi sonrası klinik ve biyokimyasal nüks ile ilişkilidir. Vezikula seminalis invazyonu veya lenf nodu metastazı olmayan olgularda önemli bir prediktif faktördür. CAP, her cerrahi sınır pozitifliğinin, genişliğinin ve lokalizasyonunun rapor edilmesi gerektiğine dikkat çekmektedir. Fakat bu faktörleri değerlendirmek için spesifik bir yöntem konusunda henüz bir fikir birliği yoktur [3].

1.7.5. Tümör hacmi:

Radikal prostatektomi materyalinin tüm kesitlerinde ölçülen tümör hacmi, Gleason skoru, cerrahi sınır pozitifliği, seminal vezikül invazyonu ve lenf nodu metastazı ile ilişkili bir prognostik faktördür [4]. Dünya çapında kabul görmüş bir yaklaşım olmasa da, prostatektomi materyallerinde tümör hacmi ölçülmelidir. Tümör hacmi ölçümü; bilgisayarlı morfometrik ölçüm, genişlik ve kesit kalınlığının basit ölçümü (bazı patologlar en büyük fokusu ölçerken, bazıları agregat hacmini rapor etmektedir), en büyük tümör genişliği, nokta sayma yöntemi ve tümör yüzdesinin görsel ölçümü gibi yöntemlerle yapılmaktadır [3].

Tümör hacmi sıklıkla radikal prostatektomi sonrasında nüks ile ilişkilidir. Yapılan bir çalışmada, tümör hacmi; radikal prostatektomi sonrası biyokimyasal nüks gösteren olgularda 2,55 cm^3, operasyon sonrası 5 yıl hastalıksız yaşayanlarda ise 0,94 cm^3 bulunmuştur [3].

İğne biyopsi materyallerinde tümör hacmini ölçmek için; pozitif kor sayısı, tüm korlardaki tümör odaklarının toplam uzunluğu, her kordaki tümör yüzdesi, bütün materyaldeki toplam tümör yüzdesi ve pozitif kor oranı gibi çok sayıda yöntem tariflenmiştir. Herhangi bir tekniğin diğerine üstünlüğünü gösteren bir bulgu yoktur. Diğer en sık kullanılan yöntemler ise her kordaki kanser yüzdesi ile toplam kanser yüzdesinin ölçümüdür. İğne biyopsilerde izlenen yaygın tümör kötü prognoz göstergesidir. Bununla birlikte iğne biyopsilerde tümör oranının düşük olması, örnekleme sınırlılıkları nedeniyle, iyi prognoz göstergesi değildir. Patolog için uygulanabilir olan ve mantıklı yaklaşım tümör içeren kor sayısını ve tümör uzunluğu veya yüzdesini rapor etmektir [1].

1.7.6. DNA ploidi:

Prostat karsinomunda DNA ploidi analizi, histopatolojik incelemeye ek olarak önemli prediktif bulgular sağlamaktadır. Diploid tümörler, anöploid tümörlere göre çok daha iyi prognozludur. Ancak prostat karsinomu ploidi paterni sıklıkla heterojendir. Doğru preoperatif

plöidi paterni değerlendirmesi için multipl biyopsi analizi önemlidir. DNA plöidi ve histolojik derece arasında önemli bir ilişki vardır ve DNA plöidi bazı hastalar için klinik olarak değerli prediktif bilgi sağlamaktadır [3]. Flow sitometri yöntemi ile değerlendirilen DNA plöidi paterni; derece, hacim, evre, nüks ve uzak metastaz ile ilişkilidir [3, 4]. Düşük dereceli tümörlerin çoğu diploid, yüksek dereceliler ise non-diploiddir. Fakat istisnai durumlar görülebilmektedir. Beş yıllık yaşam süresi; diploid tümörlerde %95, tetraploid tümörlerde %70, anöploidlerde ise %25 bulunmuştur [3].

1.7.7. Perinöral invazyon:

Perinöral invazyon, adenokarsinomlarda sık görülür [3]. Çok sık görülen perinöral invazyonun bağımsız bir prognostik faktör olduğu gösterilememiştir ve bu bulgu patoloji raporlarında rutin olarak rapor edilmemektedir [1]. Bir çalışmada perinöral invazyonun en büyük uzunluğunu ile biyokimyasal nüks arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Ancak rutin klinik pratiğe girmeden önce bu bulgunun doğrulanması gerekmektedir. İğne biyopsilerde izlenen perinöral invazyon ile tedavi sonrası nüks arasında anlamlı ilişkili saptanmıştır. Perinöral invazyonun prognostik önemi ve histolojik değerlendirmenin kolay olması nedeniyle iğne biyopsilerde rapor edilmesi önerilmektedir.

1.7.8. Nöroendokrin değişiklikler:

Nöroendokrin diferansiyasyon, prostat karsinomunun bütün türlerinde az diferansiyasyon ve kötü prognozla ilişkili bulunmuştur. Bununla birlikte nöroendokrin diferansiyasyon derecesi ile tümör progresyonu arasında ilişki olduğu iddia edilmektedir [4].

1.7.9. Lenfovasküler invazyon:

Radikal prostatektomi materyallerinde lenfovaskuler invazyon oranı %14 ile %53 arasında değişmektedir. Otörlerin büyük çoğunluğu endotelle çevrili boşlukların gösterilmesi için immünohistokimya kullanımını önermemektedir fakat tümör çevresindeki retraksiyon artefaktı, lenfovaskuler invazyon tanısında önemli zorluğa sebep olmaktadır [1]. Lenfovaskuler invazyon malignitenin güçlü bir göstergesidir. Yapılan çalışmalarda Gleason skoru, ekstraprostatik yayılım, seminal vezikül invazyonu ve tümör progresyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Peritümöral lenf damarı invazyonu ise bölgesel lenf nodu invazyonu ile ilişkilidir [4]. Evre ve dereceyi de içeren çok değişkenli çalışmalarda, lenfovaskuler invazyonun bağımsız bir prognostik faktör olduğu gösterilememiştir. Diğer taraftan Cheng ve

ark. çok değişkenli bir çalışmada, lenfovaskuler invazyonun, PSA nüksü ya da kansere bağlı ölüm açısından bağımsız bir prognostik faktör olduğunu göstermişlerdir. Çok değişkenli çalışmalarda, lenfovaskuler invazyon ve Gleason skorunun biyokimyasal nüks açısından bağımsız göstergeler olduğu saptanmıştır [3].

1.7.10. Mikrodamar dansitesi:

Mikrodamar dansitesi kanserde ve prostatik intraepitelyal neoplazide artar. Oksijen ve esansiyel elementlerin sınırlı difüzyon kapasitesi nedeniyle, tümör boyutu arttıkça yeni damarlara ihtiyaç duymaktadır. Kan damarları normalde tipik olarak düzenli bir dağılım gösterir fakat tümör içerisinde damarlar disorganize olabilir. Çoğu çalışmada mikrodamar dansitesinin Gleason skoru ve patolojik evre ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [3]. Ayrıca cerrahi ve radyoterapi alan olgularda, tümör VEGF'nin (Vaskuler endotelyal growth faktör) kötü prognozla ilişkili olduğu bulunmuştur [6].

1.7.11. Androjen reseptörü (AR):

Hedef hücrede androjen etkisi AR aracılığı ile sağlanmaktadır. Androjen reseptöründe mutasyon, tedavi almamış olgularda nadirdir ve antiandrojen tedavi alan olgularda ise ortalama %25 sıklıkla görülebilmektedir. Androjen reseptörü gen amplifikasyonu genin ekspresyonunda artışa sebep olur ve androjen bağımsız prostat karsinomlarının nerdeyse tümünde yüksek düzeyde AR eksprese edilir [3]. Metastatik prostat karsinomunda saptanan AR geninde mutasyon nedeniyle bu tümörler androjen bağımsız tümörlerdir [4]. Metastatik prostat kanseri yalnızca palyatif olarak anti-androjen ajanlar ile tedavi edilmektedir [7]. Anti-androjen tedavi semptomatik iyileşme ve hastaların çoğunda serum PSA seviyelerinde bir azalmaya yol açsa da, hemen hemen tüm bu hastalar sonunda anti-androjen tedaviye dirençli hale gelir [8]. Androjen bağımsız metastatik prostat kanseri, sürekli ve etkili bir tedavi olmadığı için, erkeklerde önemli bir ölüm nedeni olmaya devam etmektedir.

1.7.12. Proliferasyon indeksi:

Prostat karsinomunda Ki-67 indeksi; lenf nodu metastazını gösteren veya organa sınırlı olgularda, tümöre bağlı mortalite ile ilişkili bulunmuştur. Proliferasyon indeksi, Gleason skoru ile birlikte önemli bir prognostik faktördür [4].

1.7.13. PSA ve PAP (prostatik asit fosfataz)'ın immünohistokimyasal olarak gösterilmesi:

PSA ve PAP ile boyanmayan ya da zayıf boyanan prostat karsinomu alanları diğerlerine göre daha agresif davranış göstermektedir [4].

1.7.14. Kromozomal anormallikler:

Klonal karyotipik anormallikler taşıyan hastaların normal karyotipi olanlara göre yaşam sürelerinin daha kısa olduğu saptanmıştır [4].

1.7.15. P53 ekspresyonu:

Bazı ileri evre prostat karsinomlarında p53 tümör supresör gen mutasyonu saptanmıştır. Bu bulgunun evre ve dereceden bağımsız bir faktör olduğu düşünülmektedir [4].

1.7.16. RAS onkogeni:

RAS onkogeni; p21 ekspresyonu, nükleer anaplazi derecesi ile ilişkili bulunmuştur ve mikroskopik derece ile birlikte önemli bir prognostik faktördür. Bununla birlikte bu onkogenin ekspresyonunun bağımsız bir prognostik faktör olduğu yönünde veri yoktur [4].

1.7.17. Bcl-2:

Bcl-2 onkoproteini pozitifliği, prostat karsinomu nüksü ile istatistiksel olarak ilişkili saptanmıştır [4].

1.7.18. Dolaşan tümör hücreleri:

PCR tekniği ile değerlendirilen PSA ölçüm dökümü sayesinde, dolaşan tümör hücrelerinin saptanması tümör nüksünü öngörebilmektedir [4].

1.7.19. Diğer moleküler genetik belirleyiciler:

Yukarıdakilere ek olarak; 8q, p21-waf1, p27-kip1, p34-cdc-2, p120, siklinler ve katepsin-D gibi bazı moleküler genetik faktörlerin prostat karsinomunda prognostik önemi olduğu iddia edilmektedir [4]. Bu teze kaynak oluşturan mTOR yolağı da bu moleküler faktörlerden biridir. Deneysel ve klinik çalışmalarda, mTOR inhibitörlerinin çeşitli kanser türlerinde büyümeyi engelleyici ve anti-anjiogenik özellikleri olduğu gösterilmiştir [9-13]. Bu

nedenle, mTOR yolağı prostat kanserinde tedavi için önemli bir moleküler hedef olabilir.

1.8. PI3K/AKT/mTOR YOLAĞI

PI3K kanser araştırmalarında ilk olarak 1980'lerde dikkat çekmiştir. PI3K'ların moleküler klonlanması ile PI3K'ların üç sınıf içeren çok sayıda subunit ve izoformu olan kompleks bir aile olduğu ortaya çıkmıştır. PI3K, 110-kDa ve 85-kDa'luk düzenleyici subunitleri olan heterodimerik bir enzimdir. Sınıf I PI3K'lar, inositol içeren lipidlerin fosforilasyonunu katalizler. Primer in vivo substratları PIP2'dir (fosfatidil inositol 4,5 bifosfat) ve bunu ikincil haberci olan PIP3'e (fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfat) çevirirler [14]. PI3K reseptörlerine bağlanır ve çok sayıda reseptör ve nonreseptör protein tirozin kinazlar tarafından aktive edilir [13, 15]. Sınıf I PI3K'ların IA ve IB olmak üzere 2 subgrubu vardır. Sinyalleri tirozin kinazlar ve G-protein bağlı reseptörler aracılığı ile iletirler. Sınıf IA PI3K 'ların düzenleyici subünitleri üç gen (α, β ve γ) tarafından kodlanır. p85α düzenleyici, p110 katalitik subunittir. p110 katalitik subunit, *PIK3CA* geni ile kodlanırken p85 *PIK3R1* geni ile kodlanır. İnaktif p85-p110 kompleksi uygun uyaranlara yanıt olarak aktive olmak üzere dinlenme halindeki hücrelerde sitoplazmada mevcuttur.

AKT bir serin/treonin kinazdır. Amino-terminal PH domain, santral katalitik domain ve kısa karboksi-terminal düzenleyici domaini vardır. AKT ailesinin üç üyesi (AKT1, AKT2, AKT3) vardır. AKT çift düzenleyici mekanizma ile aktive olur. PI3K aktivasyonunu takiben plazma membranının iç yüzünde PIP3 üretimi, AKT'nin PH domaini ile doğrudan etkileşime girerek AKT'yi uyarır. Membranda 3-fosfoinositid bağımlı protein kinaz 1 (PDK1) isimli serin/treonin kinaz içeren diğer bir PH domain, AKT'yi fosforiller. Bu fosforilasyon AKT'nin aktivasyonu için gereklidir. Maksimal aktivasyon için PDK2 tarafından ek fosforilasyonlar gerekir. AKT aktivasyonunun detayları oldukça açık olmasına rağmen, AKT'nin downregülasyonu hakkında çok az bilgi vardır. Henüz bir AKT fosfataz tespit edilememiştir. AKT yakın zamanda tespit edilmiş olan karboksi-terminal modülatör protein (CTMP), ile inaktive edilebilir. CTMP, AKT'ye bağlanır, fosforilasyona engel olur ve downstream sinyalleri bloke eder .

AKT aktivasyonu sonucunda hücre büyümesi, çoğalması ve canlılığı uyarılır. PI3K ve AKT'nin aktive formlarının artışı ek olarak hipoksi inducible faktör-1α (HIF-1α) ve vaskuler endoteliyal growth faktör (VEGF) aracılığı ile tümör indüklü anjiogenezi uyarır. AKT'nin insülin-like growth faktör 1 (IGF-1) aracılı ve PTEN aracılı anti-apoptotik yolaklarda da

fonksiyonları vardır [14].

PI3K'lar tirozin kinaz reseptörlerinin (ör; endoteliyal growth faktör reseptör, fibroblast growth faktör reseptör, tip 1 insülin-like growth faktör reseptör, trombosit kaynaklı growth faktör reseptör) major etkileyicisidir[15]. Phosphoinositide 3-kinase/v-akt murine thymoma viral oncogene/mammalian target of rapamycin (PI3K/AKT/mTOR) sinyal kaskadı hücre büyümesi, proliferasyonu, glukoz uptake'i ve hayatta kalmasının düzenlenme mekanizmalarında doğrudan ya da dolaylı olarak önemli rol oynar [15].

mTOR proteini, anjiyojenez ve hücre döngüsü ilerlemesini kontrol eden 289-kDa'lık bir serin/treonin kinazdır [9]. Memeli hücrelerinde phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) ve serine/treonine kinase AKT, mTOR'u iki mekanizma (mTOR'un direk fosforilasyonu ve TSC2'nin inaktivasyonu) ile aktive eder. Etkinleştirilmiş mTOR (p-mTOR) downstream efektörlerinin P70S6K (S6K1 olarak da adlandırılır) ve 4E-BP1 ile protein sentezini uyarır ve hücre döngüsünün düzenlenmesini sağlar [9]. Aktive P70S6K (p-P70S6K); protein sentezini uyarır. p-mTOR tarafından 4E-BP1'in fosforilasyonu nükleer mRNA'nın cap-bağımlı translasyonunun aktivasyonu ile sonuçlanır [9]. Bu nedenle, AKT/mTOR/4E-BP1/P70S6K yolağının aktivasyonu genel protein translasyonuna neden olur. Deneysel ve klinik çalışmalarda, mTOR inhibitörlerinin çeşitli kanser türlerinde büyümeyi engelleyici ve anti-anjiogenik özellikleri olduğu gösterilmiştir [9-12].

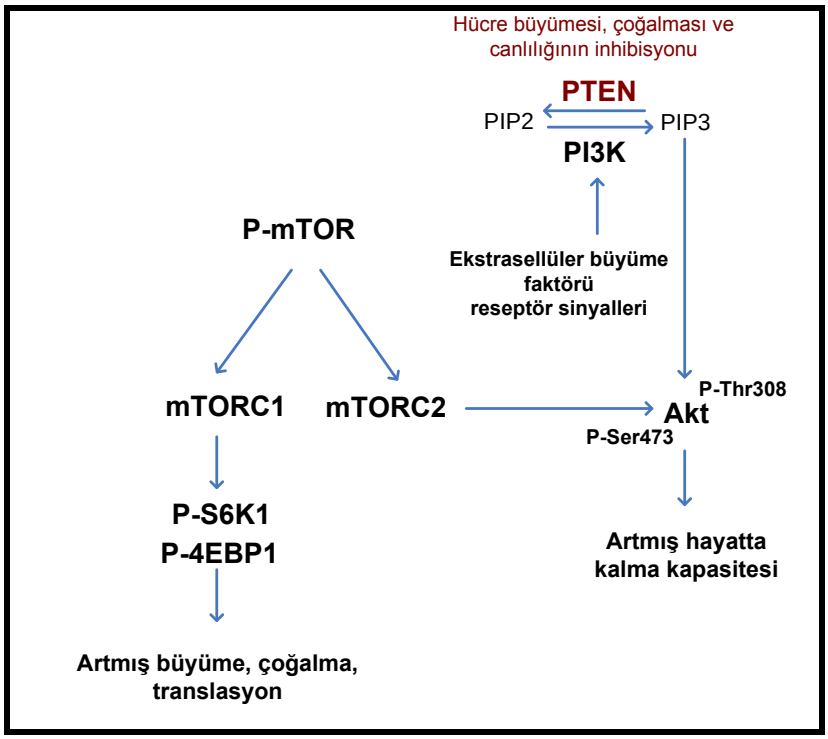
1.9. PI3K/PTEN/AKT

PI3K fonksiyonları (hücre büyümesi, proliferasyonu, hayatta kalması ve motilite), reseptör ve reseptör-dışı tirosin kinazlar tarafından üretilen sinyaller ile düzenlenir. PI3K, AKT'yi aktive ederek ve sonrasında mTOR üzerinden sinyal iletici kaskadları etkileyerek, membrana bağlı fosfolipidlerin fosforilasyonu ile hücre proliferasyonunu düzenler. Tersine kromozom 10'dan silinen tümör baskılayıcı fosfataz ve tensin homolog (PTEN), PIP3 defosforilasyonu (PIP3'ten PIP2 oluşumu) ile PI3K aktivitesine karşı durur. Bunu PI3K ilişkili AKT ve mTOR aktivasyonunu içeren downstream sinyallerini ortadan kaldırarak yapar. PI3K aktivasyonunun karmaşık düzenlenmesi göz önüne alındığında AKT, PTEN ve mTOR'un rutin prostat kanserinde değişmiş olması şaşırtıcı değildir. Örneğin; primer prostat kanserlerinin %70'inde PTEN'de bir kopya inaktivedir. Metastatik hastalıklarda ise iki kopyada da kayıp tanımlanmıştır. Düşük dereceli prostat kanserleri ile (≤Gleason 7) karşılaştırıldığında pAKT sıklıkla yüksek dereceli prostat kanserlerinde (≥Gleason 8)

saptanmıştır. Ve bu artmış mTOR aktivitesi ile koreledir. Farelerdeki PTEN kaybı modelleri, hastalığın ilerlemesi, moleküler belirteçlerin ekspresyonu ve benzer gen ekspresyon profilleri ile insan prostat kanserlerini taklit eder. Ayrıca, bu modeller PTEN kaybının prostat kanseri başlatılmasında etkili olduğuna dair kanıtlar sunmaktadır. Örneğin PTEN'deki heterozigot delesyon önemli ölçüde hücre proliferasyonunu artırır.

PTEN kaybı AR sinyalizasyonu ve maksimal androjen blokajı (MAB) tedavisine hücresel yanıtı değiştirir ve kastrasyona dirençli prostat kanseri oluşumu için önemli bir belirleyicidir. Homozigot PTEN kaybı gösteren fare modellerinde hayvanların PIN lezyonları geliştirilirken kastrasyonu ve gen profilleri, PTEN kaybının AR aktivitesini düzenleyerek androjen cevaplı gen ekspresyonunu baskıladığını göstermiştir.

PTEN kaybı ya da PI3K/AKT yolağının aktivasyonu invaziv ve metastatik insan prostat kanserlerinde sıklıkla bulunur. Bu gözleme dair bir yorumda PTEN kaybının hücresel yaşlanmayı teşvik ettiği bildirilmiştir. PTEN kaybı, tümör başlamasında ya da hastalık saldırganlığında çok az etkisi olan diğer değişmiş yolaklar ile birlikte bulunduğunda kooperatif bir etki oluşturabilir. Örneğin tümör supresör olan P53'teki kayıp ile birlikte PTEN kaybı tümör progresyon hızını artırır ve ölümcül prostat kanseri progresyonuna yol açar. Düşük PTEN ekspresyonu gösteren tümörlerdeki insan epidermal büyüme faktörü 2 ve 3 (HER2/3) reseptör tirozin kinazlarındaki overekspresyon prostat kanseri hastalarında kötü prognoz ile ilişkilidir. Bu yolları inhibe etmek için şu an araştırmalar devam etmektedir. mTOR inhibitörleri in vitro tek ajan olarak bazı çalışmalarda etkinlik göstermiştir ancak klinik çalışmalarda daha az umut verici sonuçlar vermiştir. PI3K ve AR nün karşılıklı fonksiyon düzenlemesi göz önüne alındığında kombine PI3K ve AR inhibisyonu denenmektedir. Bu stratejinin preklinik değerlendirmesi sırasında PTEN yokluğunda PI3K inhibisyonu ve AR antagonizmasının kombinasyonunun tekli tedavilere kıyasla derin bir antiproliferatif etkisi saptanmıştır. Baskın sinyal yollarının çift düzenlenmesi sayesinde tedavi etkinliği artar. Bu kombinasyon tedavisi prostat kanseri tedavisinin geleceğini oluşturmaktadır [16].



Şekil 1: Şematik mTOR/PTEN/PI3K/AKT yolağı

1.10. STATHMİN-1

Stathmin, mikrotübül dinamiklerinde, önemli rol oynayan sitozolik bir fosfoproteindir. PTEN kaybını gösteren bir belirleyicidir [17]. Hücre iskelet komponentleri hücre şekli, hareketliliği ve bölünmeyi düzenler [18]. Stathmin serbest tubulin dimerlerini ayrıştırarak ya da mikrotübül yıkımını indükleyerek mikrotübülleri depolimerize eder ve böylece hücre diferansiyasyonunda ve migrasyonunda rol oynar [19-21]. Stathmin kanser hücresinin hayatta kalması için gerekli olabilir [22]. Stathmin farklı insan kanserlerinde eksprese edilir [17, 21, 23-28]. Son zamanlarda, Stathminin over kanserlerinde PI3K aktivitesi ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir ve over kanser progresyonuna yol açabileceği hipotezi ileri sürülmüştür [25]. Stathminin inhibe olması HIF-1 ve VEGF ekspresyonu ile birlikte p70S6K fosforilasyonunu azaltır [27]. Bu Stathminin mTOR/p70S6K yolağını düzenlediğini gösterir. Stathminin ilaç duyarlılığını etkilediği bulunmuştur. Örneğin, Stathmin susturulması mikrotübül dinamikleri bozulmuş kanser hücrelerinin anti-kanser ilaçlara direncini kırar [23, 26, 29]. Sisplatin-dirençli ve sisplatin-duyarlı over dokuları içeren bir gen profili çalışmasında, Stathmin sisplatin direnci ile ilintili protein olarak tarif edilmiştir [30]. Artmış Stathmin ekspresyonu paclitaxel-resistan ovarian kanser hücrelerinde de görülmüştür. Bu direnç tubulin polimerizasyonunun önlenmesi ve mikrotübül destabilizasyonu ile geliştirilir [23]. Stathmin susturulması gastrik karsinom hücrelerinin proliferasyonunu azaltmıştır [31]. Stathmin

fonksiyonunu azaltmaya yönelik hedefe yönelik tedavi çalışmaları sürmektedir. Bu noktada, mikrotübül dinamikleri ve anjiyogenezdeki Stathmin rolünü netleştirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

1.11. SİTOKROM P450-4Z1 (CYP4Z1)

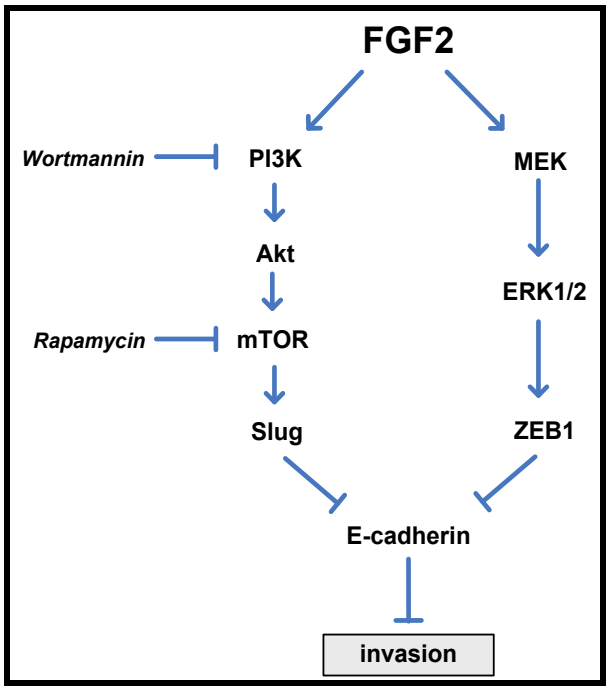
Sitokrom P450 (CYP) 4Z1, CYP4 ailesinin sıklıkla insan meme ve over kanserinde aşırı eksprese edilen, yüksek dereceli tümörler ve kötü prognoz ile ilişkili yeni bir üyesidir. Bununla birlikte, tümör gelişiminde CYP4Z1'in kesin rolü tam olarak bilinmemektedir. Yapılan bir çalışmada CYP4Z1 aşırı ekspresyonunun tümör anjiyogenezini ve meme kanserinin büyümesini teşvik ettiği gösterilmiştir. Bu tür metal iyonu bağlayıcı proteinler, gene ekspresyonu, proliferasyon, diferansiyasyon, ve hayatta kalma gibi merkezi hücresel süreçleri düzenleyici rollere sahiptir. CYP4Z1'in overekspresyonu PIK3CA mutasyonuna sahip meme kanserlerinde görülmüştür. Artmış CYP4Z1 ekspresyonunun VEGF ekspresyonunu düzenleyerek tümör anjiogenezi ve büyümesini, PI3K/AKT ve ERK1/2 aktivasyonu aracılığı ile etkilediği düşünülmektedir [32].

1.12. E-CADHERİN

E-cadherin; hücre-hücre adezyon proteinidir ve tümör supresör etkiye sahiptir. Tümör progresyonunda E-cadherin ekspresyon ya da fonksiyon kaybı sıktır [33, 34]. E-cadherin'in tümör hücre invazyonunu engellediği bilinmektedir. E-cadherin defektli karsinomlarda E-cadherin'in reekspresyonu hücreleri daha az invaziv ve daha az agresif fenotipe dönüştürür . E-cadherin kaybının over kanser metastazı, peritoneal yayılım ve kötü prognozla ilişkili [35] olduğu, prostat kanserlerinde yüksek Gleason skoru ile korele olduğu[36] bilinmektedir. E-cadherin fonksiyon kaybı; E-cadherin geninde mutasyon [37], E-cadherin promotörün hipermetilasyonu [38] ve E-cadherin'in transkripsiyonel represyonu [39] ile meydana gelebilir. FGF2 (fibroblast growth faktör) hücre proliferasyonu ,migrasyon ve diferansiyasyonu gibi çeşitli biyolojik aktivitelerde temel bir rol oynar [40]. FGF2 aynı zamanda bir anjiyogenik faktör olarak tarif edilmiştir ve daha yakın zamanda peritoneal metastaz gelişimine katkısı olduğu gösterilmiştir [41]. Bozulmuş FGF sinyalinin, tümör gelişimi ve progresyonunda etkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır [42]. FGF2'nin farklı hücre tiplerinde E-cadherin ekspresyonunu düzenlediği bildirilmiştir. Pankreatik adenokarsinomda FGF-1 ve FGF2'nin E-cadherin ekspresyonunu upregule ettiği gösterilmiştir [43]. Mevcut bilgiler; over karsinomu hücrelerinde PI3K/Akt/mTOR ve MAPK/ERK sinyal yolakları aracılığı ile E-cadherin down

regulasyonunda FGF'nin önemli bir rolü olduğunu desteklemektedir. FGF2'nin reseptörlerine bağlanması, PI3K/Akt ve MAPK/ERK downstream sinyal yolaklarının aktivasyonuna yol açar [44]. Ortaya çıkan kanıtlar bu yolların E-cadherin düzenlenmesinde rolü olduğunu göstermektedir [45]. Ayrıca, mTOR yolağının PI3K/Akt sinyali ile ilişkili aberan inhibisyonu, FGF2'nin indüklediği E-cadherin inhibisyonu ve hücre invazyonunu bloke eder. Bu sonuçlar, over kanser hücrelerinde, mTOR sinyali için IGF-1 kaynaklı E-cadherin downregülasyonu gereksinimini gösteren çalışma ile tutarlıdır [46].

İki çalışma birlikte ele alındığında, over kanseri hücrelerinde; FGF2 bağımlı PI3K/Akt/mTOR ve MAPK/ERK aktivasyonunun FGF2 bağımlı E-cadherin downregülasyonu ve hücre invazyonunu da içerdiğini göstermektedir [46, 47].

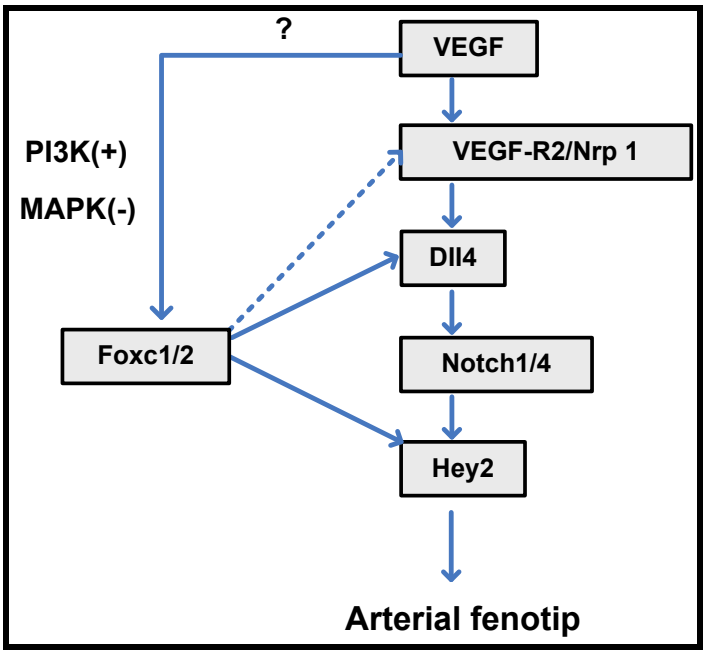


Şekil 2: mTOR yolağının PI3K/Akt sinyali ile ilişkili inhibisyonu ve FGF2'nin indüklediği E-cadherin inhibisyonu

1.13. HEY2

VEGF sinyalleri Notch1 ve ligandı olan DII4'ü içeren Delta-Notch yolağını aktive eder. Notch sinyalleri Hey transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu düzenler. Foxc proteini de DII4 promoterını direkt aktive eder. Birlikte ele alındığında Foxc transkripsiyon faktörleri, arteriyal özelleşmede Notch sinyallerini harekete geçirir. Bununla birlikte arteriyel gen

ekspresyonunda VEGF sinyallerinin Foxc aracılı transkripsiyonal kontrolünde direkt etkileşiminin olup olmadığı net olarak bilinmemektedir. Foxc proteinlerinin Hey2 de dahil olmak üzere birden fazla arteriyel spesifik geni düzenlemesi muhtemeldir. VEGF aracılı PI3K yolağının DII4 ve Hey2 promoterlarının aktivasyonu ile Foxc proteinlerinin aktivitesini düzenlediği gösterilmiştir [48].



Şekil 3: PI3K ve Hey2 ilişkisi şematik anlatım

Prostat kanserlerinde yapılan bir çalışmada Hey2 pozitifliğinin biyokimyasal nüks, lokal rekürrens, uzak metastaz ve adjuvan tedaviye yanıtsızlıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu marker hastalık progresyonu ve saldırganlığını tahmin etmede yararlı olabilir. Ancak prostat kanseri prognozunu belirlemede ve tedavi cevabını ön görmede klinik yararını ve tekrarlanabilirliğini belirlemek için geniş çaplı çalışmalarla doğrulanması gerekmektedir [49].

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. GENEL BİLGİLER

2003-2013 yılları arasında DEÜTF Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda "Prostat Karsinomu" tanısı alan 385 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Olgulara ait DEÜTF Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Preparat ve Blok Arşivi' nde bulunan Hematoksilen & Eozin (H&E) boyalı preparatlardan tümörü demonstre eden preparatlar seçilmiştir. Daha sonra tümörün karakteristik özelliğini en iyi yansıtan 3 mm çapındaki alan işaretlenmiştir. Bu işaretlenen

alanın preparatlarına ait parafin bloklar üzerinde de işaretlenmiştir. Daha sonra quick ray sistemi kullanılarak dokular çapları 3 mm olan ve 30 adet kor içeren doku mikroarray kalıplarına (TMA) yerleştirilmiştir (Tissue-Tek® Quick- Ray™ 8018). Hazırlanan parafin mikroarray kalıpları etüvde 55 ^{0}C'de metal nitelikteki mikroarray kalıbının içine yerleştirilerek eritilmiş ve sonrasında kasetlenerek bloklama işlemi tamamlanmıştır. Takiben immunhistokimyasal boyamalar için bu TMA'lardan 3 mikron kalınlıkta kesitler alınmıştır.



Resim 1: İmmünohistokimya çalışılması için hazırlanan TMA bloklar

2.2. İMMUNHİSTOKİMYASAL İNCELEME

Alınan kesitlere Stathmin-1, PIK3CA, Hey2, E-cadherin immunhistokimyasal boyamaları Ventana Benchmark Ultra otomatik boyama makinasında standart prosedür kullanılarak yapıldı. Cyp4z1, AKT1, p-P70S6kinaz, p-mTOR, 4E-BP1, Anti-PTEN immunhistokimyasal boyamaları için aşağıdaki boyama protokolü uygulandı.

1. Kesitler etüvde yaklaşık 55˚C'de bir gece bekletilerek parafin eritildi. Ertesi gün kesitler ksilen ile deparafinize edildi.
2. Kesitler azalan alkol serilerinde rehidrate edildi.
3. Kesitler distile su ile yıkandı.
4. Su banyosunda 95-98˚C'de Ph 7 EDTA buffer solüsyonunda Cyp4z1 ve AKT1 için 30 dk, p-P70S6kinaz, p-mTOR ve 4E-BP1 için 40 dk, Anti-PTEN için 50 dk kaynatılarak ısı yardımıyla epitopun açığa çıkması sağlandı.

5. Kesitler oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Daha sonra kesitler TRIS tampon solüsyonunda yıkandı.
6. % 3 lük hidrojen peroksit solüsyonunda 15 dk bekletilerek endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Daha sonra kesitler Tris buffer solüsyonunda yıkandı.
7. Ultra V block damlatılıp 10 dk bekletilerek nonspesifik bağlanma reaksiyonları önlendi.
8. Yıkama yapmadan lamların üzerindeki solüsyonlar dökülerek; üzerine 1/50 dilüsyonda uygun primer antikor damlatıldı ve oda sıcaklığında 1 saat antikor inkubasyonu yapıldı ve antikorun bağlanması sağlandı.
9. Daha sonra kesitler Tris buffer solüsyonunda yıkandı.
10. Biotin damlatılarak oda sıcaklığında 10 dk inkübasyon sağlandı. Daha sonra kesitler Tris buffer solüsyonunda yıkandı.
11. Streptavidin damlatılarak oda sıcaklığında 10 dk inkübasyon sağlandı.
12. Daha sonra kesitler Tris buffer solüsyonunda 20 dk bekletildi.
13. 1 ml substrata ve 1 damla kromojen eklenerek (1:1) diaminobenzidin (DAB) solüsyonu hazırlandı.
14. Her kesite 100 mikrolitre hazırlanan DAB solüsyonundan damlatılarak oda sıcaklığında 7 dk bekletildi.
15. Ardından yaya alınan kesitler çeşme suyunda yıkandı.
16. Mayer‘s hematoksilende yaklaşık 1dk bekletilerek kontrast boyanma sağlandı.
17. Ardından kesitler çeşme suyunda yıkandı.
18. Yükselen alkol serilerinde her birinde 2 dk bekletilerek geçirilen kesitler daha sonra 10 dk ksilolde bekletildi.
19. Son olarak ise kesitler Tissue-Tek® otomatik kapama cihazında kapatıldı.

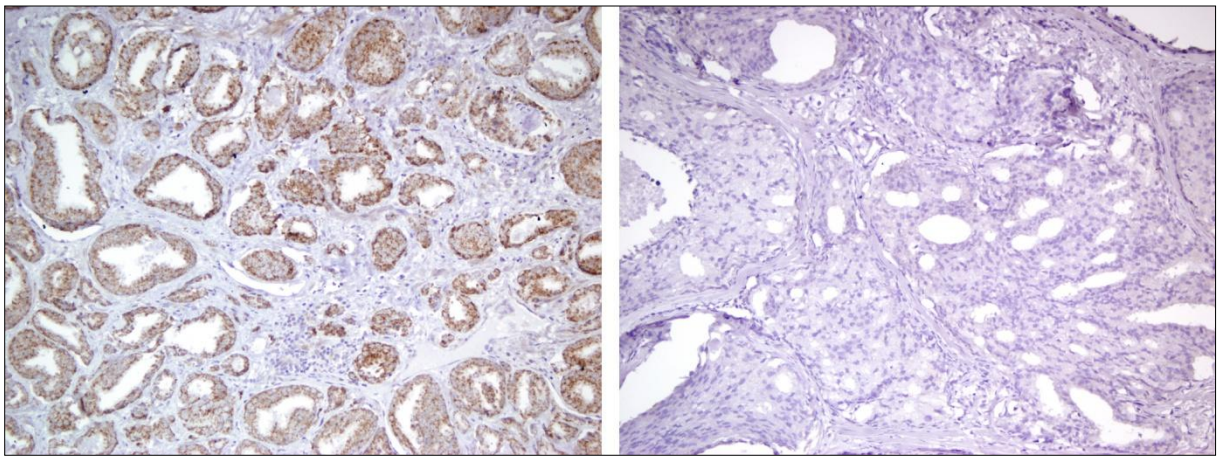
Antikor	**Katalog / Lot numarası**	**Klon**	**Firma**	**Dilüsyon oranı**	**Pozitif kontrol dokusu**
p-mTOR	SC-101738 / D0214	rabbit poliklonal	Santa Cruz	1:50	insan kolon adenokarsinomu
AKT1	NB100-79891 / GR129604-6	rabbit monoklonal	Novus biologicals	1:50	insan böbrek dokusu
PIK3CA	NBP2-19804 / 40254	rabbit poliklonal	Novus biologicals	1:500	insan meme karsinomu
p-P70S6kinaz	SC-101768 / D2211	rabbit monoklonal	Santa Cruz	1:50	insan meme karsinomu
4E-BP1	SC-9977 / D1513	mouse monoklonal	Santa Cruz	1:50	insan meme karsinomu
PTEN	04-036 / 242448	mouse monoclonal	Millipore	1:50	insan meme karsinomu
Stathmin-1	NB110-57602 / GR96185-10	rabbit monoklonal	Novus biologicals	1:250	lenf düğümü dokusu
Cyp4z1	NBP1-91817 / R41181	rabbit poliklonal	Novus biologicals	1:50	insan böbrek dokusu
E-cadherin	4A2C7 / 1574938A	mouse monoklonal	Invitrogen	1:50	insan prostat dokusu
Hey2	LS-C166848 / 51291	rabbit poliklonal	LifeSpan BioSciences	1:100	insan beyin dokusu

Tablo 1: Kullanılan primer antikorlara ait bilgiler

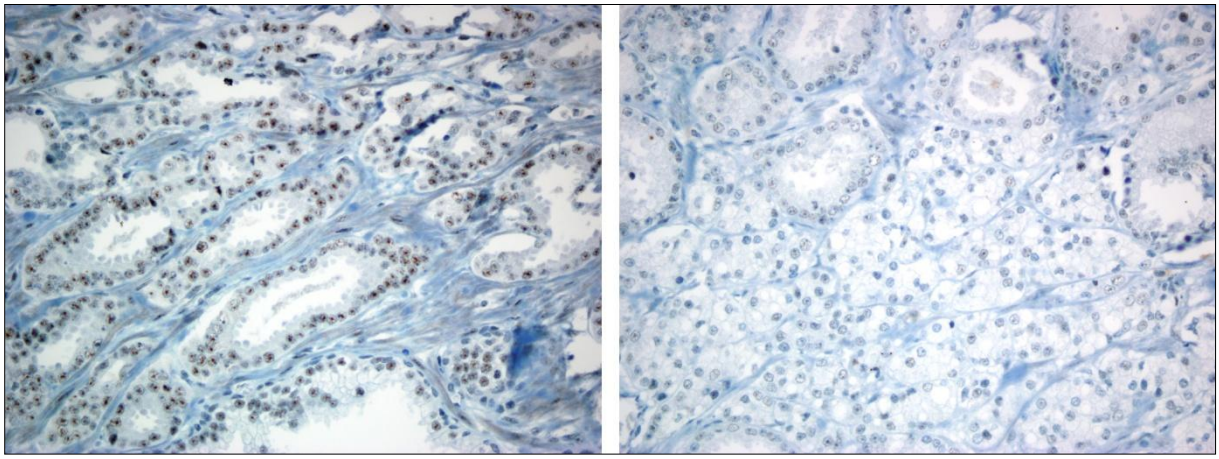
AKT1, p-mTOR, 4E-BP1, p-P70S6kinaz, Cyp4z1 ve Hey2 için sitoplazmik, PIK3CA için nukleer, PTEN ve Stathmin-1 için nukleer ve sitoplazmik, , E-cadherin için membranöz boyanma pozitif kabul edilmiştir [25, 28, 49-54].

Olguların tümü mikroskopta değerlendirilir iken nekroz, stroma, normal epitel ve farklı kenar efekti alanları değerlendirme dışı bırakılmıştır. Tüm immunhistokimyasal boyanmalarda boyanma olmaması 0, %0-10 arası tümör hücresinde boyanma olması 1, %10-50 arası tümör hücresinde boyanma olması 2, %50'den fazla tümör hücresinde boyanma olması 3 puan olarak değerlendirilmiştir. Boyanma yoğunluk skoru bulunurken, tümör hücrelerindeki zayıf boyanma yoğunluğu (+) 1, orta boyanma yoğunluğu (++) 2, güçlü boyanma yoğunluğu (+++)

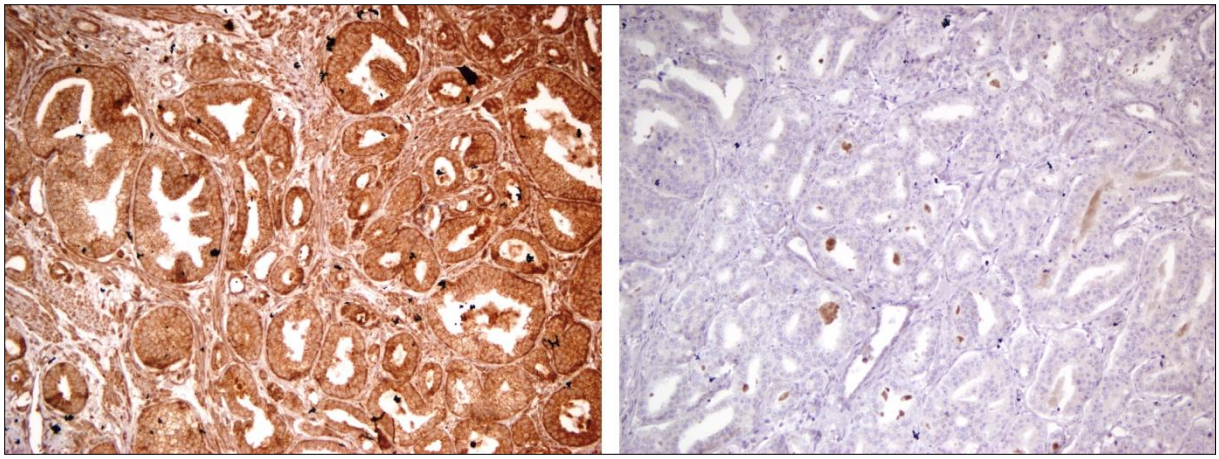
3 puan olarak kabul edilmiştir. İmmunreaktivite skoru ve boyanma yoğunluk skoru birbiri ile çarpılarak 0-9 arası toplam boyanma skoru elde edilmiştir [55, 56]. Elde edilen toplam boyanma skoru kendi içinde gruplandırılmış olup 0-3 arası skoru olanlar zayıf ekspresyon (negatif boyanma), 4-9 arası olanlar güçlü ekspresyon (pozitif boyanma) olarak kabul edilmiştir [56].



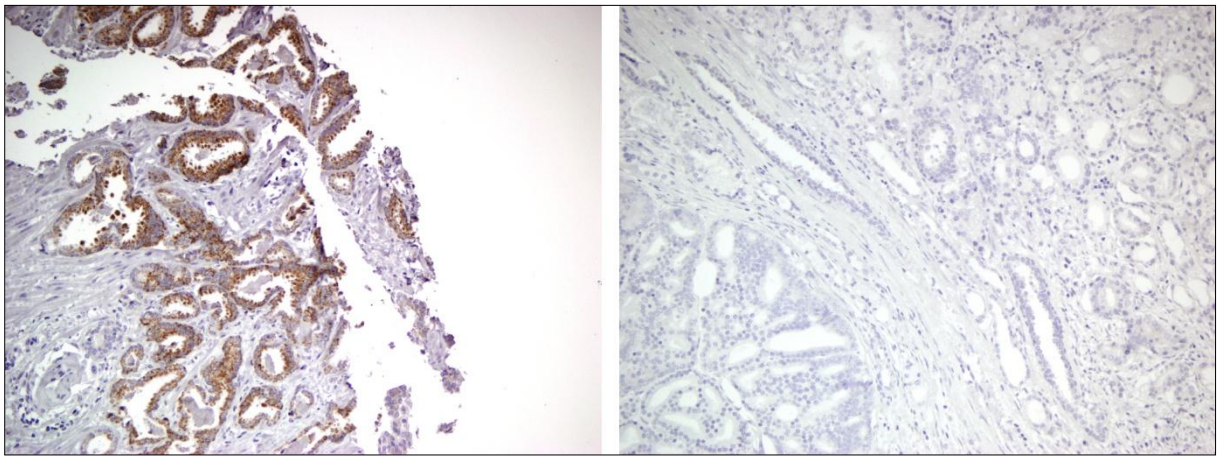
Resim 2: mTOR, pozitif ve negatif boyanma örnekleri, x20



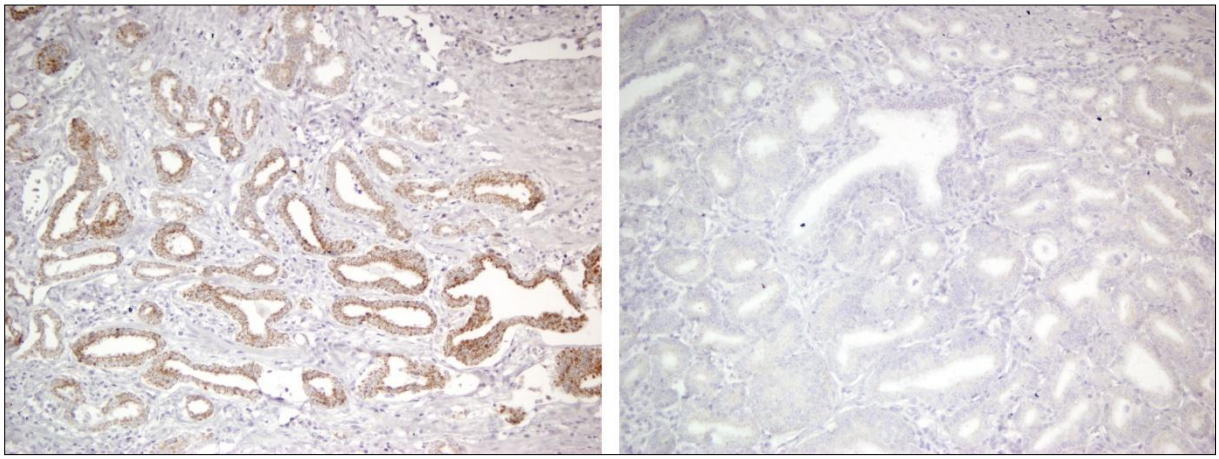
Resim 3: PI3K, pozitif ve negatif boyanma örnekleri, x40



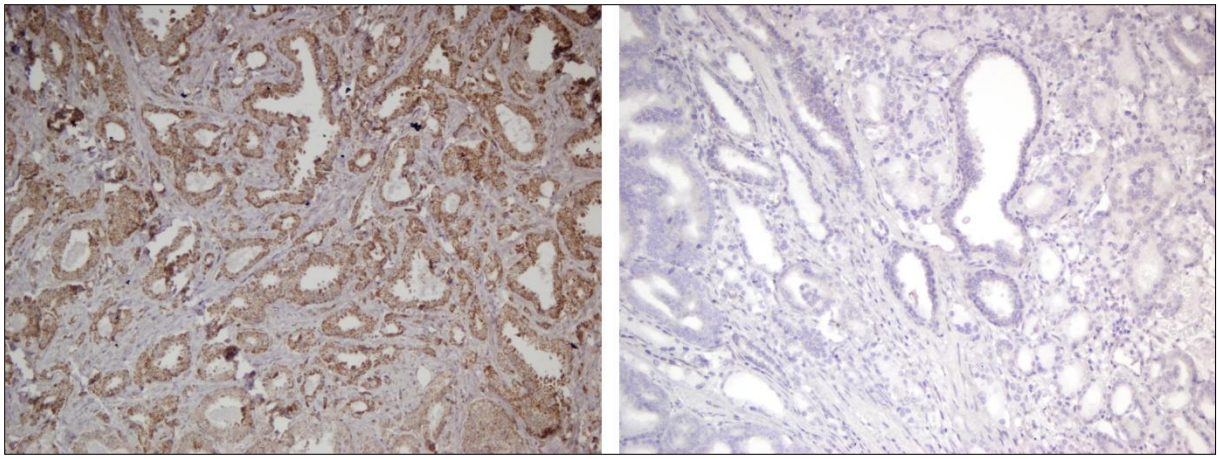
Resim 4: AKT, pozitif ve negatif boyanma örnekleri, x20



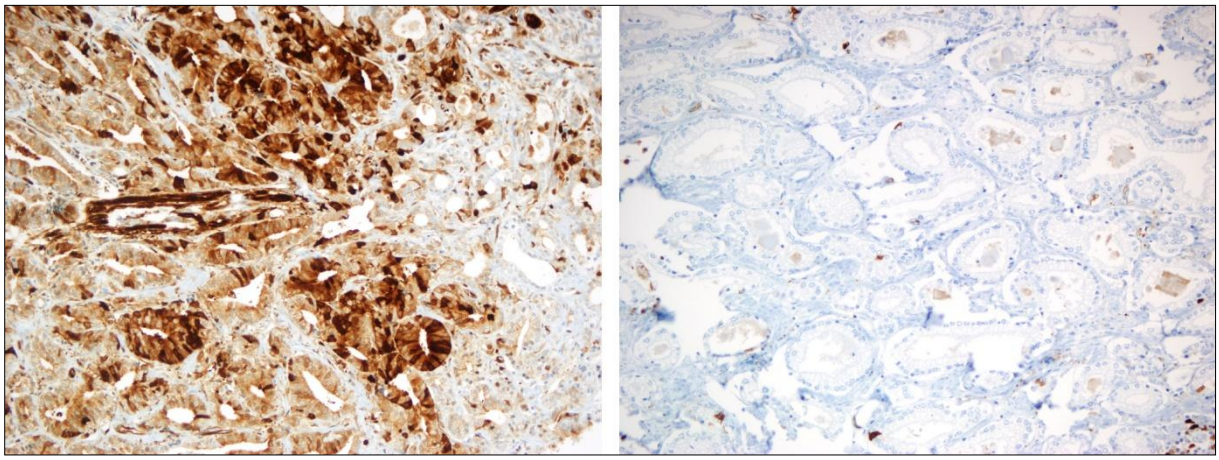
Resim 5: 4E-BP1, pozitif ve negatif boyanma örnekleri, x20



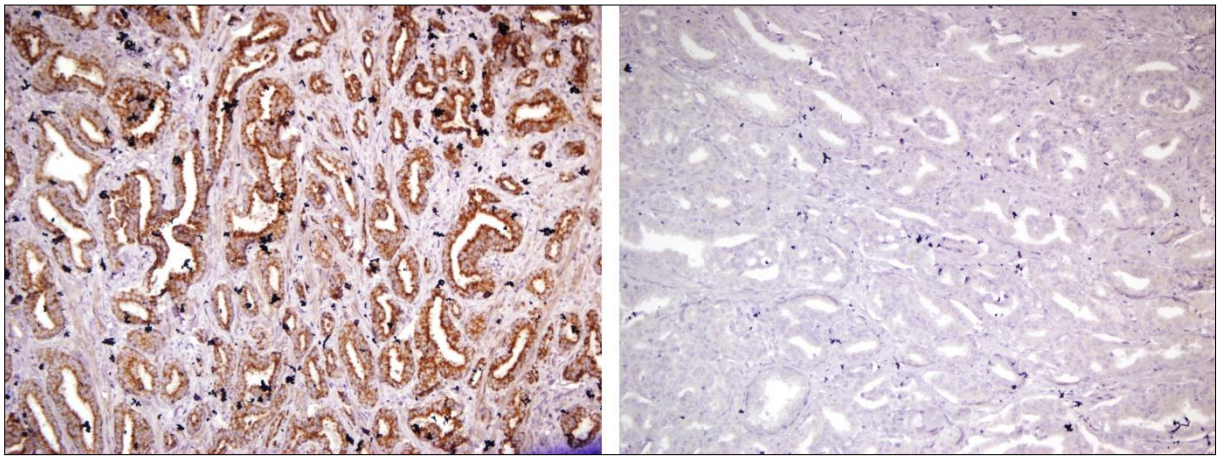
Resim 6: p-P70S6K, pozitif ve negatif boyanma örnekleri, x20



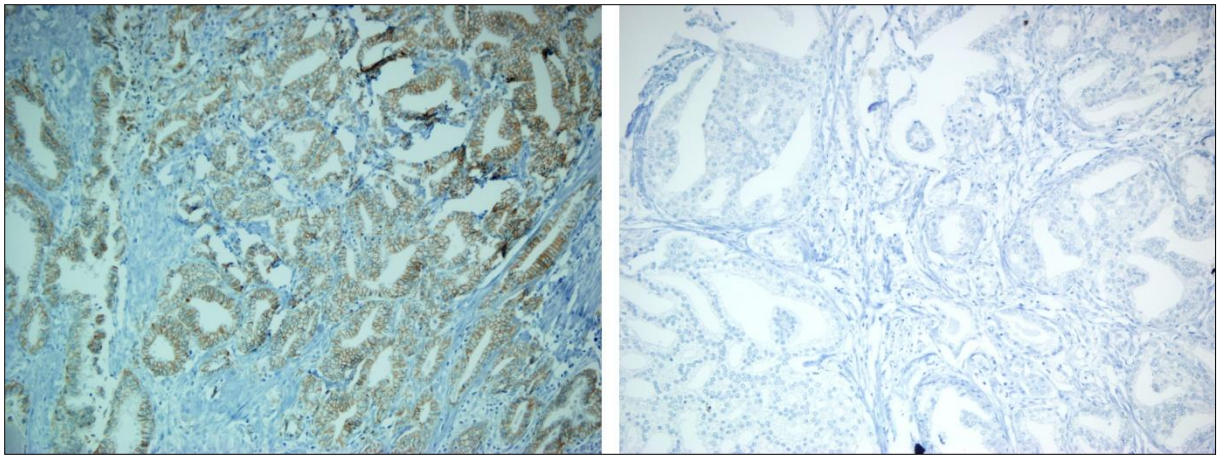
Resim 7: PTEN, pozitif ve negatif boyanma örnekleri, x20



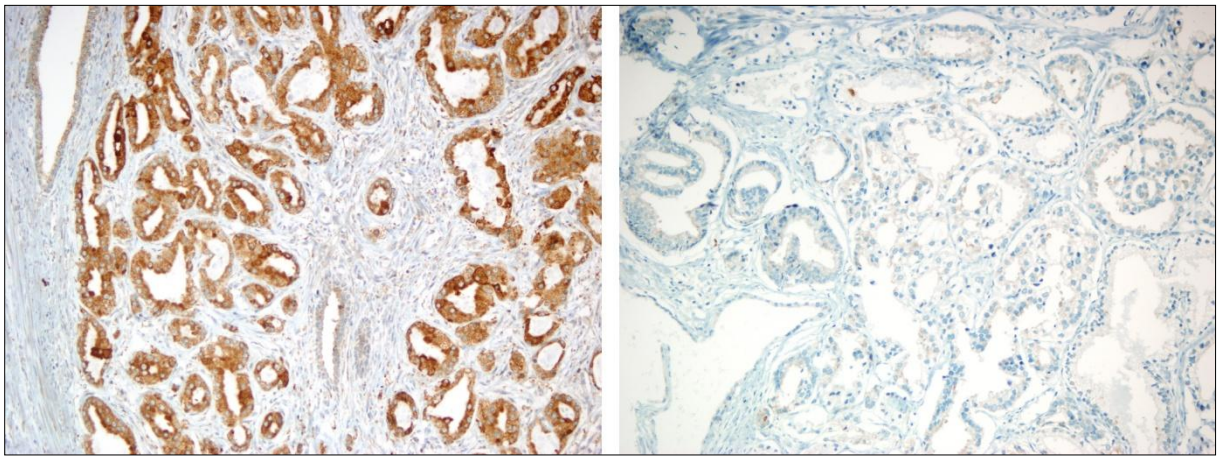
Resim 8: Stathmin-1, pozitif ve negatif boyanma örnekleri, x20



Resim 9: CYP4Z1, pozitif ve negatif boyanma örnekleri, x20



Resim 10: E-cadherin, pozitif ve negatif boyanma örnekleri, x20



Resim 11: Hey2, pozitif ve negatif boyanma örnekleri, x20

2.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

İmmunhistokimyasal veriler Statistical Packace For the Social Sciences (SPSS) 15.0 kullanılarak istatistiksel verilere dönüştürülmüştür. Analizlerde sürekli değişkenler için bağımsız grup T testi, süreksiz değişkenler için de Pearson ki-kare testi uygulandı. Tüm testler iki yönlüydü ve $p \leq 0.05$ değerleri anlamlı olarak değerlendirildi. Bağımsız değişkenlerin biyokimyasal nüks ile ilişkisi Cox regresyon modeli ile değerlendirildi (%95 güven aralığı). Tüm istatistiksel incelemeler SPSS Statistics v.22 ile yapıldı.

3.BULGULAR

3.1. PATOLOJİK VE KLİNİK BULGULAR

Çalışma kapsamına alınan 389 hastanın yaşları 43 ile 80 arasında değişmektedir ve yaş ortalaması 60,42 olarak hesaplanmıştır. Gleason skoru olguların 115'inde (%29,56) 3+3=6, 225'inde (%57,84) 3+4=7, 27'sinde (%6,94) 4+3=7, 5'inde (%1,28) 4+4=8, 5'inde (%1,28) 4+5=9, 9'unda (%2,31) 5+4=9 ve 2'sinde (%0,51) 5+5=10 olarak değerlendirilmiştir. Bir olguda tedaviye bağlı değişiklikler nedeniyle Gleason skoru değerlendirmesi yapılamamıştır. Tersiyer paterni olan 107 olgudan 76'sında tersiyer patern 5, 31'inde tersiyer patern 4 olarak değerlendirilmiştir. 256 olgu (%65,80) pT2, 95 olgu (%24,43) pT3a, 38 olgu (%9,77) ise pT3b evresinde saptanmıştır. Olguların tümör hacmi 0.01 cc ile 20.90 cc arasında değişmektedir ve ortalaması 3.54 cc olarak hesaplanmıştır.

Olguların 310'unda (%79,7) perinöral invazyon izlenmiştir. Altı (%1,55) olguda vaskuler invazyon görülmüştür. 106 (%27,25) olguda cerrahi sınır pozitif olarak izlenmiştir. Lenf nodu materyali bulunan 242 olgudan 5'inde (%2,00) lenf nodu metastazı saptanmıştır. Klinik takibi olan 350 olgudan 33'ünde (%9,42) biyokimyasal nüks (PSA nüksü) saptanmıştır. Takip süreleri 1 ile 111 ay arasında değişmekte olup ortalama takip süresi 33,52 aydır.

Takip edilen 350 olguda patolojik prognostik parametreler (Gleason skoru, tersiyer patern, vaskuler invazyon, perinöral invazyon, cerrahi sınır pozitifliği, lenf nodu tutulumu, pT evresi) ve klinik prognostik parametre olan biyokimyasal nüks Pearson ki-kare testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Biyokimyasal nüks ile Gleason skoru (p=0,000; r=0.182), cerrahi sınır pozitifliği (p=0,000; r=0,237), pT evresi (p=0,001; r=0,104) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır. Biyokimyasal nüks ve tersiyer patern karşılaştırmasında p değeri 0,051 olarak bulunmuştur. Biyokimyasal nüks ile vaskuler invazyon, perinöral invazyon, lenf nodu tutulumu arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Biyokimyasal nüks ve tümör hacmi arasındaki ilişki T-test ile değerlendirilmiş olup istatistiksel anlamlılık (p=0,040) saptanmıştır.

3.2. İMMUNHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Tersiyer patern, vasküler invazyon ve lenf nodu tutulumu parametreleri çok az sayıda olguda saptandığından istatistiksel değerlendirme dışında tutulmuştur. İmmunhistokimyasal belirleyiciler patolojik prognostik parametrelerden Gleason skoru, perinöral invazyon varlığı,

cerrahi sınır tutulumu, pT evresi, tümör hacmi ile Pearson ki-kare testi kullanılarak karşılaştırılmış anlamlı olanlarda Spearman korelasyon analizi uygulanmıştır. Her bir immünohistokimyasal belirleyici ile değerlendirmede teknik nedenlerle 5-12 olgu değerlendirme dışı kalmıştır.

Stathmin-1 immunhistokimyası toplam boyanma skoruna göre 199 olgu negatif, 178 olgu pozitif olarak değerlendirilmiştir. Stathmin-1 immunhistokimyası ile Gleason skoru (p=0,002; r=0,169), perinöral invazyon (p=0,001; r=0,171), pT evresi (p=0,007; r=0,160) arasında istatistiksel anlamlılık saptanmıştır. Stathmin-1 immunhistokimyası ile, cerrahi sınır pozitifliği, tümör hacmi arasında istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır.

E-cadherin immunhistokimyası toplam boyanma skoruna göre 62 olgu negatif, 321 olgu pozitif olarak değerlendirilmiştir. E-cadherin immunhistokimyası ile Gleason skoru , perinöral invazyon, cerrahi sınır pozitifliği, pT evresi, tümör hacmi arasında istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır.

Hey2 immunhistokimyası toplam boyanma skoruna göre 96 olgu negatif, 283 olgu pozitif olarak değerlendirilmiştir. Hey2 immunhistokimyası ile Gleason skoru, perinöral invazyon, cerrahi sınır pozitifliği, pT evresi, tümör hacmi arasında istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır.

AKT1 immunhistokimyası toplam boyanma skoruna göre 119 olgu negatif, 265 olgu pozitif olarak değerlendirilmiştir. AKT1 immunhistokimyası ile Gleason skoru, perinöral invazyon, cerrahi sınır pozitifliği, pT evresi, tümör hacmi arasında istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır.

CYP4Z1 immunhistokimyası toplam boyanma skoruna göre 142 olgu negatif, 240 olgu pozitif olarak değerlendirilmiştir. CYP4Z1 immunhistokimyası ile Gleason skoru, perinöral invazyon, cerrahi sınır pozitifliği, pT evresi, tümör hacmi arasında istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır.

p-P70S6K immunhistokimyası toplam boyanma skoruna göre 271 olgu negatif, 115 olgu pozitif olarak değerlendirilmiştir. p-P70S6K immunhistokimyası ile Gleason skoru (p=0,000, r=0,120), pT evresi (p=0,001, r=0,088) arasında istatistiksel anlamlılık saptanmıştır. p-P70S6K immunhistokimyası ile perinöral invazyon, cerrahi sınır pozitifliği, tümör hacmi arasında istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır.

4E-BP1 immunhistokimyası toplam boyanma skoruna göre 371 olgu negatif, 17 olgu pozitif olarak değerlendirilmiştir. 4E-BP1 immunhistokimyası ile Gleason skoru, perinöral

invazyon, cerrahi sınır pozitifliği, pT evresi, tümör hacmi arasında istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır.

mTOR immunhistokimyası toplam boyanma skoruna göre 274 olgu negatif, 110 olgu pozitif olarak değerlendirilmiştir. mTOR immunhistokimyası ile Gleason skoru, perinöral invazyon, cerrahi sınır pozitifliği, pT evresi, tümör hacmi arasında istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır.

PTEN immunhistokimyası toplam boyanma skoruna göre 312 olgu negatif, 74 olgu pozitif olarak değerlendirilmiştir. PTEN immunhistokimyası ile Gleason skoru (p=0,002, r=0,059), pT evresi (p=0,034, r=0,042) arasında istatistiksel anlamlılık saptanmıştır. PTEN immunhistokimyası ile perinöral invazyon, cerrahi sınır pozitifliği, tümör hacmi arasında istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır.

PIK3CA immunhistokimyası toplam boyanma skoruna göre 261 olgu negatif, 125 olgu pozitif olarak değerlendirilmiştir. mTOR immunhistokimyası ile Gleason skoru, perinöral invazyon, cerrahi sınır pozitifliği, pT evresi, tümör hacmi arasında istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır.

İmmunhistokimyasal belirleyicilerin Cox regresyon modeline göre biyokimyasal nuks etkisi Tablo 2 'de verilmiştir.

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% CI for Exp(B)	
							Lower	Upper
ECADHERIN	.065	.784	.007	1	.934	1.067	.230	4.958
Hey2	.272	.672	.164	1	.685	1.313	.352	4.898
AKT	-1.030	.480	4.603	1	.032	.357	.139	.915
CYP4Z1	-.189	.562	.113	1	.736	.828	.275	2.488
p-P70S6K	.700	.666	1.105	1	.293	2.014	.546	7.426
p-MTOR	-.771	.616	1.564	1	.211	.463	.138	1.548
PTEN	.105	.773	.019	1	.892	1.111	.244	5.058
STATHMİN-1	.724	.480	2.273	1	.132	2.062	.805	5.285
PIK3CA	-.914	.543	2.839	1	.092	.401	.138	1.161

Tablo2: İmmunhistokimyasal belirleyicilerin Cox regresyon modeline göre biyokimyasal nuks etkisi

Stathmin-1, E-cadherin, Hey2, p-P70S6K, PTEN pozitifliğinin biyokimyasal nüks riskini sırasıyla 2,062 kat (%106), 1,067 kat (%6,7), 1,313 kat (%31,3), 2,014 kat (%101), 1,111 kat (%11) artırdığı gözlendi ancak istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı.

AKT, CYP4Z1, mTOR, PIK3CA pozitifliğinin biyokimyasal nüks riskini sırasıyla 0,357 kat (%64,3), 0,828 kat (%17,2), 0,463 kat (%53,7), 0,401 kat (%59,9) azalttığı saptandı ancak bunlardan yalnızca AKT ile istatistiksel anlamlılık (p=0,032) saptandı.

4E-BP1 değişkenini modele eklediğimizde model, parametre tahminlerini yapamadı. Bu nedenle bu değişken ile istatistiksel değerlendirme yapilamadi.

4.TARTIŞMA

Prostat karsinomu ABD'de, erkeklerde en sık görülen malignitedir ve kansere bağlı ölümlerin %10'undan sorumludur. Erkeklerde kansere bağlı ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada gelmektedir ve erkeklerde kansere bağlı ölümlerin %5.6, tüm kansere bağlı ölümlerin ise %3.2'sinden sorumludur [1, 4]. Prostat karsinomu sıklığı son 20 yılda, serum PSA testinin erken tanıda başarılı bir şekilde kullanımı ile birlikte artmıştır [3].

Prostat karsinomlu hastaların klinik gidişlerini öngörmek için çok sayıda prognostik parametre tanımlanmıştır.

Patolojik evre tümör yayılımını gösteren en önemli ve prognozu en doğru gösteren parametredir. Prostat kapsülü, vezikula seminalis ve lenf nodu invazyonu gibi patolojik evreyi belirleyen faktörlerle prognoz arasında ilişki vardır.

Mikroskopik derecelendirme klinik veya patolojik evre ile direk ilişkilidir [3]. Gleason skoru kullanılarak yapılan mikroskopik derecelendirme, bağımsız bir prognostik faktördür ve diğer derecelendirme sistemlerinden belirgin olarak üstündür [4].

Cerrahi sınır pozitifliği radikal prostatektomi sonrası klinik ve biyokimyasal nüks ile ilişkilidir. Vezikula seminalis invazyonu veya lenf nodu metastazı olmayan olgularda önemli bir prediktif faktördür.

Morfometrik tekniklerle radikal prostatektomi materyalinin tüm kesitlerinde ölçülen tümör hacmi; Gleason skoru, kapsüler invazyon, cerrahi sınır pozitifliği, seminal vezikül invazyonu ve lenf nodu metastazı ile ilişkili bir prognostik faktördür [4]. Dünya çapında kabul görmüş bir yaklaşım olmasada, prostatektomi materyallerinde tümör hacmi ölçülmelidir. Tümör hacmi sıklıkla radikal prostatektomi sonrasında nüks ile ilişkilidir.

Çalışmamızda Gleason skoru, vaskuler invazyon, perinöral invazyon, cerrahi sınır pozitifliği, lenf nodu tutulumu, pT evresi biyokimyasal nüks ile karşılaştırılmıştır. Prognostik önemi kanıtlanmış olan klinik pratikte faydalı pT evresi, Gleason skoru, cerrahi sınır pozitifliği ve hakkında kapsamlı çalışmalar yapılmış ancak önemi onaylanmamış bir faktör olan tümör hacmi ile biyokimyasal nüks arasında istatistiksel anlamlılık saptanmıştır. Bu bulgu literatür verileri ile uyumludur. Vaskuler invazyon, perinöral invazyon arasında ise anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Çalışmamız patolojik prognostik parametrelerin biyokimyasal nüks ile karşılaştırılmasına ek olarak mTOR yolağı ve ilişkili proteinlerin prostat karsinomlarında

etkilerinin olup olmadığına ve sonuçta da tedavide kullanılabilecek bir hedef olup olmadıklarına yönelik bir hipoteze dayanmaktadır.

Dai ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı bir çalışmada 4E-BP1 ve P70S6K pozitifliğinin prostat karsinomlarında pT evresi ve uzak metastaz ile; AKT ve mTOR ekspresyon artışının da yüksek Gleason skoru ile ilişkili olduğu saptanmıştır [57]. Kreisberg ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [58] ise AKT ekpresyonunun artmış olmasının biyokimyasal nüks için iyi bir öngördürücü olduğu saptansa da, 2014 yılında yayınlanan 90 hasta ile yapılmış karşıt bir çalışmada AKT ve mTOR ekspresyonunun Gleason skoru, pT evresi ve biyokimyasal nüks ile istatistiksel anlamlı bir fark göstermediği [59], yine Sutherland ve arkadaşlarının 2014 yılında yayınladığı bir çalışmada artmış m-TOR ekspresyonu ile Gleason skoru, pT evresi ve biyokimyasal nüks arasında anlamı ilişki bulunmadığı [60] saptanmıştır. Bizim çalışmamızda 4E-BP1 ve mTOR ile patolojik ve klinik prognostik parametreler arasında istatistiksel anlamlılık saptanmasa da P70S6K ile Gleason skoru ve pT evresi arasında istatistiksel anlamlılık olduğu ve AKT pozitifliğinin biyokimyasal nüks riskini %64 azalttığı saptanmıştır. Bu konuda literatürde çelişkili sonuçlar olduğundan daha fazla çalışma ile AKT'nin prognostik değerinin araştırılmasına ihtiyaç vardır.

PIK3CA gen mutasyonu, çeşitli kanser türlerinde yapılan moleküler genetik çalışmalarla gösterilmiş olsa da bu belirtecin immunhistokimyasal olarak kullanımı bizim çalışmamızda prostat karsinomlarında biyokimyasal nüks ve prognostik parametrelerle ilişkili bulunmamıştır [61-66].

McMenamin ve arkadaşlarının 1999 yılında 109 hasta ile yaptığı bir çalışmada PTEN ekspresyon kaybının Gleson skoru ve pT evresi ile korele olduğu bulunmuştur [67] . Bedolla ve arkadaşlarının çalışmasında PTEN ekspresyon kaybı ile AKT fosforilasyonunun artışının birlikte bulunmasının biyokimyasal nüks riskini öngördürücü olduğu saptanmıştır [68]. Çoğu çalışmada PTEN ekspresyon kaybının prostat kanseri agresifliği ile ilişkili olduğu bulunmasına karşın Schmitz ve arkadaşlarının çalışmasında PTEN ekspresyon kaybının Gleason skoru ve PSA düzeyi ile istatistiksel anlamlı ilişkisi saptanmamıştır [69]. Bizim çalışmamızda ise PTEN pozitifliği ile Gleason skoru ve pT evresi arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Ancak biyokimyasal nüks ile anlamlı ilişki saptanmamıştır.

E-cadherin; hücre-hücre adezyon proteinidir ve tümör supresör etkiye sahiptir. Tümör progresyonunda E-cadherin ekspresyon ya da fonksiyon kaybı sıktır. E-cadherin'in tümör hücre invazyonunu engellediği bilinmektedir. Prostat tümörlerinde E-cadherin ekspresyonu çeşitli çalışmalara konu olmuştur. 2001 yılında Kallakury ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada E-cadherin ekspresyon kaybı Gleson skoru, pT evresi ve biyokimyasal nüks ile

ilişkili bulunmuştur [70]. De Marzo ve arkadaşlarının 1999 yılında, Jaggi ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı iki çalışmada E-cadherin kaybının prostat kanserlerinde yüksek Gleason skoru ve pT evresi ile korele olduğu [36, 71], 2001 yılında Rubin ve arkadaşlarının çalışmasında ise bu sonuçlara karşıt olarak aberan E-cadherin ekspresyonunun cerrahi sınır pozitifliği, yüksek Gleason skoru ve yüksek biyokimyasal nüks oranı ile ilişkili olduğu bulunmuştur [72]. Bizim çalışmamızda E-cadherin ekspresyonu ile patolojik prognostik parametreler ve biyokimyasal nüks arasında istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır.

Stathmin, mikrotübül dinamiklerinde, önemli rol oynayan sitozolik bir fosfoproteindir. PTEN kaybını gösteren bir belirleyici olduğu düşünülmektedir [17]. Hücre diferansiyasyonunda ve migrasyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Son zamanlarda over kanserlerinde PI3K aktivitesi ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir ve over kanser progresyonuna yol açabileceği hipotezi ileri sürülmüştür. Stathminin inhibe olması HIF-1 ve VEGF ekspresyonu ile birlikte P70S6K fosforilasyonunu azaltır. Bu Stathminin mTOR/P70S6K yolağını düzenlediğini gösterir [25, 27]. Küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde, kolorektal, gastrik, nazofarengeal kanserlerde kötü prognostik olduğunu gösteren çalışmalar vardır [26, 73-75]. Ghosh ve arkadaşları 2007 yılındaki çalışmasında prostat karsinomlarında Gleason 5 paterninde Stathmin-1'in arttığını göstermiştir [24]. Tradonsky ve arkadaşlarının 2012 yılında 240 radikal prostatektomi olgusu ile yaptığı bir çalışmada Stathmin-1 ile biyokimyasal nüks arasında anlamlı ilişki bulunmuştur [49]. Bizim çalışmamızda ise Stathmin-1 ile biyokimyasal nüks arasında anlamlı ilişki bulunmazken Gleason skoru, pT evresi ve perinöral invazyon arasında istatistiksel anlamlılık saptanmıştır.

Tümör gelişiminde CYP4Z1'in kesin rolü tam olarak bilinmese de yapılan bir çalışmada aşırı ekspresyonunun tümör anjiyogenezini ve meme kanserinin büyümesini teşvik ettiği gösterilmiştir. Gen ekspresyonu, proliferasyon, diferansiyasyon, ve hayatta kalma gibi merkezi hücresel süreçleri düzenleyici rollere sahiptir. CYP4Z1'in overekspresyonu PIK3CA mutasyonuna sahip meme kanserlerinde görülmüştür [32]. Tradonsky ve arkadaşlarının [49] prostat tümörlerinde yaptığı çalışmasında CYP4Z1 negatifliği biyokimyasal nüks ile anlamlı bulunurken, çalışmamızda patolojik prognostik parametreler ve biyokimyasal nüks ile CYP4Z1 arasında istatistiksel anlamlılık saptamadık. CYP4Z1'in prostat kanserlerinde prognostik olarak anlamının net değerlendirilebilmesi için geniş serilere dayanan daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu görüşündeyiz.

Bizim çalışmamızda Hey2 ekspresyonu patolojik prognostik parametreler ve biyokimyasal nüks ile ilişkili bulunmamıştır. Ancak prostat kanserlerinde yapılan bir çalışmada Hey2 pozitifliğinin biyokimyasal nüks, lokal rekürrens, uzak metastaz ve adjuvan

tedaviye yanıtsızlıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir [49]. Bu belirteç hastalık progresyonu ve saldırganlığını tahmin etmede yararlı olabilir fakat bu konuda çok sınırlı sayıda çalışma olması nedeniyle prostat kanseri prognozunu belirlemede, tedaviye yanıtı ön görmede klinik yararını ve tekrarlanabilirliğini belirlemek için geniş çaplı çalışmalarla doğrulanması gerekmektedir.

Tüm bu bulgular ışığında mTOR yolağında etkileri olan proteinlerden p-P70S6K, PTEN ve Stathmin-1 ile prognostik değeri yüksek iki parametre olan Gleason skoru ve pT evresi arasında ve AKT1 ekspresyonu ile biyokimyasal nüks arasındaki anlamlı ilişki saptandığından bu proteinlerin prostat kanserinde prognostik değerleri olabileceği, tedavide geniş çalışmalarla desteklenebilirse etkili olabileceklerini düşündürmektedir. mTOR yolağında yer alan mekanizmalara etki eden hedefe yönelik tedaviler prostat kanserinde de etkin olabilir.

5. SONUÇLAR

1- Biyokimyasal nüks ile Gleason skoru (p=0,000; r=0.182), cerrahi sınır pozitifliği (p=0,000; r=0,237), pT evresi (p=0,001; r=0,104) ve tümör hacmi (p=0,040) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır.

2- Biyokimyasal nüks ve tersiyer patern karşılaştırmasında p değeri 0,051 olarak bulunmuş ve istatistiksel anlamlı kabul edilmemiştir.

3- Stathmin-1 ekspresyonu ile Gleason skoru (p=0,002; r=0,169), perinöral invazyon (p=0,001; r=0,171) ve pT evresi (p=0,007; r=0,160) arasında istatistiksel anlamlılık saptanmıştır.

4- p-P70S6K ekspresyonu ile Gleason skoru (p=0,000, r=0,120), pT evresi (p=0,001, r=0,088) arasında istatistiksel anlamlılık saptanmıştır.

5- PTEN ekspresyonu ile Gleason skoru (p=0,002, r=0,059) ve pT evresi (p=0,034, r=0,042) arasında istatistiksel anlamlılık saptanmıştır.

6- AKT pozitifliği biyokimyasal nüks riskini 0,357 kat (%64,3) azaltıyor ve istatistiksel olarak da anlamlılık (p=0,032) saptanmıştır.

7- Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar, mTOR yolağında etkileri olan p-P70S6K, PTEN ve Stathmin-1 ile prognostik değeri yüksek iki parametre olan Gleason skoru ve pT evresi arasında ve AKT ekspresyonu ile biyokimyasal nüks arasında anlamlı ilişki saptandığından bu proteinlerin prostat kanserinde prognostik değerleri olabileceği, mTOR yolağındaki mekanizmalara etki eden hedefe yönelik tedavilerin prostat kanserinde de kullanılabileceğini düşündürmektedir.

6. KAYNAKLAR:

1. Eble JN, World Health Organization. ve International Agency for Research on Cancer., Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. 2004, Lyon: IARC Press. 359 p.
2. Fletcher CDM, Diagnostic histopathology of tumors. Fourth edition. ed. 2013
3. Bostwick DG CL, Meiers I, Urologic Surgical Pathology. 3th ed. 2013, Philadelphia, PA 19103-2899: Elsevier Inc. 408-516.
4. Rosai J ve Ackerman LV, Rosai and Ackerman's surgical pathology. 10th ed. 2011, Edinburgh: Elsevier/Mosby.
5. Pathologists CoA, Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Carcinoma of the Prostate Gland. Based on AJCC/UICC TNM, 7th edition. 2012. 2012.
6. Martin NE, Mucci LA, Loda M ve Depinho RA, Prognostic determinants in prostate cancer. Cancer J, 2011. 17(6): p. 429-37.
7. Chowdhury S ve Kirby R, Advances in the treatment of metastatic prostate cancer. Practitioner, 2013. 257(1760): p. 15-8, 2.
8. Debes JD ve Tindall DJ, Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer. N Engl J Med, 2004. 351(15): p. 1488-90.
9. Guertin DA ve Sabatini DM, Defining the role of mTOR in cancer. Cancer Cell, 2007. 12(1): p. 9-22.
10. Zhou X, Tan M, Stone Hawthorne V, Klos KS ve ark., Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. Clin Cancer Res, 2004. 10(20): p. 6779-88.
11. Lang SA, Gaumann A, Koehl GE, Seidel U ve ark., Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model. Int J Cancer, 2007. 120(8): p. 1803-10.
12. Nozawa H, Watanabe T ve Nagawa H, Phosphorylation of ribosomal p70 S6 kinase and rapamycin sensitivity in human colorectal cancer. Cancer Lett, 2007. 251(1): p. 105-13.
13. Gao N, Zhang Z, Jiang BH ve Shi X, Role of PI3K/AKT/mTOR signaling in the cell cycle progression of human prostate cancer. Biochem Biophys Res Commun, 2003. 310(4): p. 1124-32.

14. Vivanco I ve Sawyers CL, The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. Nat Rev Cancer, 2002. 2(7): p. 489-501.
15. Korkolopoulou P, Levidou G, Trigka EA, Prekete N ve ark., A comprehensive immunohistochemical and molecular approach to the PI3K/AKT/mTOR (phosphoinositide 3-kinase/v-akt murine thymoma viral oncogene/mammalian target of rapamycin) pathway in bladder urothelial carcinoma. BJU Int, 2012. 110(11 Pt C): p. E1237-48.
16. Schrecengost R ve Knudsen KE, Molecular pathogenesis and progression of prostate cancer. Semin Oncol, 2013. 40(3): p. 244-58.
17. Wik E, Birkeland E, Trovik J, Werner HM ve ark., High phospho-Stathmin(Serine38) expression identifies aggressive endometrial cancer and suggests an association with PI3K inhibition. Clin Cancer Res, 2013. 19(9): p. 2331-41.
18. Curmi PA, Gavet O, Charbaut E, Ozon S ve ark., Stathmin and its phosphoprotein family: general properties, biochemical and functional interaction with tubulin. Cell Struct Funct, 1999. 24(5): p. 345-57.
19. Iancu-Rubin C, Gajzer D, Tripodi J, Najfeld V ve ark., Down-regulation of stathmin expression is required for megakaryocyte maturation and platelet production. Blood, 2011. 117(17): p. 4580-9.
20. Yoshie M, Kashima H, Bessho T, Takeichi M ve ark., Expression of stathmin, a microtubule regulatory protein, is associated with the migration and differentiation of cultured early trophoblasts. Hum Reprod, 2008. 23(12): p. 2766-74.
21. Liu F, Sun YL, Xu Y, Liu F ve ark., Expression and phosphorylation of stathmin correlate with cell migration in esophageal squamous cell carcinoma. Oncol Rep, 2013. 29(2): p. 419-24.
22. Nemunaitis J, Stathmin 1: a protein with many tasks. New biomarker and potential target in cancer. Expert Opin Ther Targets, 2012. 16(7): p. 631-4.
23. Balachandran R, Welsh MJ ve Day BW, Altered levels and regulation of stathmin in paclitaxel-resistant ovarian cancer cells. Oncogene, 2003. 22(55): p. 8924-30.
24. Ghosh R, Gu G, Tillman E, Yuan J ve ark., Increased expression and differential phosphorylation of stathmin may promote prostate cancer progression. Prostate, 2007. 67(10): p. 1038-52.
25. Karst AM, Levanon K, Duraisamy S, Liu JF ve ark., Stathmin 1, a marker of PI3K pathway activation and regulator of microtubule dynamics, is expressed in early pelvic serous carcinomas. Gynecol Oncol, 2011. 123(1): p. 5-12.

26. Tan HT, Wu W, Ng YZ, Zhang X ve ark., Proteomic analysis of colorectal cancer metastasis: stathmin-1 revealed as a player in cancer cell migration and prognostic marker. J Proteome Res, 2012. 11(2): p. 1433-45.
27. Tamura K, Yoshie M, Miyajima E, Kano M ve ark., Stathmin Regulates Hypoxia-Inducible Factor-1alpha Expression through the Mammalian Target of Rapamycin Pathway in Ovarian Clear Cell Adenocarcinoma. ISRN Pharmacol, 2013. 2013: p. 279593.
28. Wang F, Xuan XY, Yang X, Cao L ve ark., Stathmin is a marker of progression and poor prognosis in esophageal carcinoma. Asian Pac J Cancer Prev, 2014. 15(8): p. 3613-8.
29. Su D, Smith SM, Preti M, Schwartz P ve ark., Stathmin and tubulin expression and survival of ovarian cancer patients receiving platinum treatment with and without paclitaxel. Cancer, 2009. 115(11): p. 2453-63.
30. Gong F, Peng X, Zeng Z, Yu M ve ark., Proteomic analysis of cisplatin resistance in human ovarian cancer using 2-DE method. Mol Cell Biochem, 2011. 348(1-2): p. 141-7.
31. Kang W, Tong JH, Chan AW, Lung RW ve ark., Stathmin1 plays oncogenic role and is a target of microRNA-223 in gastric cancer. PLoS One, 2012. 7(3): p. e33919.
32. Yu W, Chai H, Li Y, Zhao H ve ark., Increased expression of CYP4Z1 promotes tumor angiogenesis and growth in human breast cancer. Toxicol Appl Pharmacol, 2012. 264(1): p. 73-83.
33. Nollet F, Berx G ve van Roy F, The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. Mol Cell Biol Res Commun, 1999. 2(2): p. 77-85.
34. Yap AS, The morphogenetic role of cadherin cell adhesion molecules in human cancer: a thematic review. Cancer Invest, 1998. 16(4): p. 252-61.
35. Yuecheng Y, Hongmei L ve Xiaoyan X, Clinical evaluation of E-cadherin expression and its regulation mechanism in epithelial ovarian cancer. Clin Exp Metastasis, 2006. 23(1): p. 65-74.
36. Jaggi M, Johansson SL, Baker JJ, Smith LM ve ark., Aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin in human prostate cancer. Urol Oncol, 2005. 23(6): p. 402-6.
37. Hajra KM ve Fearon ER, Cadherin and catenin alterations in human cancer. Genes Chromosomes Cancer, 2002. 34(3): p. 255-68.

38. Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H ve ark., E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. Cancer Res, 1995. 55(22): p. 5195-9.
39. Hennig G, Behrens J, Truss M, Frisch S ve ark., Progression of carcinoma cells is associated with alterations in chromatin structure and factor binding at the E-cadherin promoter in vivo. Oncogene, 1995. 11(3): p. 475-84.
40. Chalkiadaki G, Nikitovic D, Berdiaki A, Sifaki M ve ark., Fibroblast growth factor-2 modulates melanoma adhesion and migration through a syndecan-4-dependent mechanism. Int J Biochem Cell Biol, 2009. 41(6): p. 1323-31.
41. Sako A, Kitayama J, Yamaguchi H, Kaisaki S ve ark., Vascular endothelial growth factor synthesis by human omental mesothelial cells is augmented by fibroblast growth factor-2: possible role of mesothelial cell on the development of peritoneal metastasis. J Surg Res, 2003. 115(1): p. 113-20.
42. Turner N ve Grose R, Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. Nat Rev Cancer, 2010. 10(2): p. 116-29.
43. El-Hariry I, Pignatelli M ve Lemoine NR, FGF-1 and FGF-2 modulate the E-cadherin/catenin system in pancreatic adenocarcinoma cell lines. Br J Cancer, 2001. 84(12): p. 1656-63.
44. Eswarakumar VP, Lax I ve Schlessinger J, Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. 16(2): p. 139-49.
45. Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T ve Okayasu I, Requirement of the Akt/beta-catenin pathway for uterine carcinosarcoma genesis, modulating E-cadherin expression through the transactivation of slug. Am J Pathol, 2009. 174(6): p. 2107-15.
46. Lau MT ve Leung PC, The PI3K/Akt/mTOR signaling pathway mediates insulin-like growth factor 1-induced E-cadherin down-regulation and cell proliferation in ovarian cancer cells. Cancer Lett, 2012. 326(2): p. 191-8.
47. Lau MT, So WK ve Leung PC, Fibroblast growth factor 2 induces E-cadherin down-regulation via PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK signaling in ovarian cancer cells. PLoS One, 2013. 8(3): p. e59083.
48. Hayashi H ve Kume T, Foxc transcription factors directly regulate Dll4 and Hey2 expression by interacting with the VEGF-Notch signaling pathways in endothelial cells. PLoS One, 2008. 3(6): p. e2401.
49. Tradonsky A, Rubin T, Beck R, Ring B ve ark., A search for reliable molecular markers of prognosis in prostate cancer: a study of 240 cases. Am J Clin Pathol, 2012.

137(6): p. 918-30.

50. Ferraldeschi R, Nava Rodrigues D, Riisnaes R, Miranda S ve ark., PTEN Protein Loss and Clinical Outcome from Castration-resistant Prostate Cancer Treated with Abiraterone Acetate. Eur Urol, 2014.
51. Tapia O, Riquelme I, Leal P, Sandoval A ve ark., The PI3K/AKT/mTOR pathway is activated in gastric cancer with potential prognostic and predictive significance. Virchows Arch, 2014. 465(1): p. 25-33.
52. Yamada Y, Kohashi K, Fushimi F, Takahashi Y ve ark., Activation of the Akt-mTOR pathway and receptor tyrosine kinase in patients with solitary fibrous tumors. Cancer, 2014. 120(6): p. 864-76.
53. Trigka EA, Levidou G, Saetta AA, Chatziandreou I ve ark., A detailed immunohistochemical analysis of the PI3K/AKT/mTOR pathway in lung cancer: correlation with PIK3CA, AKT1, K-RAS or PTEN mutational status and clinicopathological features. Oncol Rep, 2013. 30(2): p. 623-36.
54. Chun SH, Jung CK, Won HS, Kang JH ve ark., Divergence of P53, PTEN, PI3K, Akt and mTOR expression in tonsillar cancer. Head Neck, 2014.
55. Kao CS, Idrees MT, Young RH ve Ulbright TM, Solid pattern yolk sac tumor: a morphologic and immunohistochemical study of 52 cases. Am J Surg Pathol, 2012. 36(3): p. 360-7.
56. Putti TC, To KF, Hsu HC, Chan AT ve ark., Expression of epidermal growth factor receptor in head and neck cancers correlates with clinical progression: a multicentre immunohistochemical study in the Asia-Pacific region. Histopathology, 2002. 41(2): p. 144-51.
57. Dai B, Kong YY, Ye DW, Ma CG ve ark., Activation of the mammalian target of rapamycin signalling pathway in prostate cancer and its association with patient clinicopathological characteristics. BJU Int, 2009. 104(7): p. 1009-16.
58. Kreisberg JI, Malik SN, Prihoda TJ, Bedolla RG ve ark., Phosphorylation of Akt (Ser473) is an excellent predictor of poor clinical outcome in prostate cancer. Cancer Res, 2004. 64(15): p. 5232-6.
59. Ko YH, Miyake H, Behnsawy HM, Cheon J ve ark., Limited significance of activated Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway in prostate cancer progression. Urol Int, 2014. 93(2): p. 146-51.
60. Sutherland SI, Pe Benito R, Henshall SM, Horvath LG ve ark., Expression of phosphorylated-mTOR during the development of prostate cancer. Prostate, 2014.

74(12): p. 1231-9.

61. Lu W, Wei H, Li M, Wang H ve ark., Identification of KRAS and PIK3CA but not BRAF mutations in patients with gastric cancer. Mol Med Rep, 2015.
62. Wang L, Shan L, Zhang S, Ying J ve ark., PIK3CA gene mutations and overexpression: implications for prognostic biomarker and therapeutic target in Chinese esophageal squamous cell carcinoma. PLoS One, 2014. 9(7): p. e103021.
63. Wang L, Hu H, Pan Y, Wang R ve ark., PIK3CA mutations frequently coexist with EGFR/KRAS mutations in non-small cell lung cancer and suggest poor prognosis in EGFR/KRAS wildtype subgroup. PLoS One, 2014. 9(2): p. e88291.
64. Firoozinia M, Zareian Jahromi M, Moghadamtousi SZ, Nikzad S ve ark., PIK3CA gene amplification and PI3K p110alpha protein expression in breast carcinoma. Int J Med Sci, 2014. 11(6): p. 620-5.
65. Cathomas G, PIK3CA in Colorectal Cancer. Front Oncol, 2014. 4: p. 35.
66. Garcia-Carracedo D, Chen ZM, Qiu W, Huang AS ve ark., PIK3CA mutations in mucinous cystic neoplasms of the pancreas. Pancreas, 2014. 43(2): p. 245-9.
67. McMenamin ME, Soung P, Perera S, Kaplan I ve ark., Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. Cancer Res, 1999. 59(17): p. 4291-6.
68. Bedolla R, Prihoda TJ, Kreisberg JI, Malik SN ve ark., Determining risk of biochemical recurrence in prostate cancer by immunohistochemical detection of PTEN expression and Akt activation. Clin Cancer Res, 2007. 13(13): p. 3860-7.
69. Schmitz M, Grignard G, Margue C, Dippel W ve ark., Complete loss of PTEN expression as a possible early prognostic marker for prostate cancer metastasis. Int J Cancer, 2007. 120(6): p. 1284-92.
70. Kallakury BV, Sheehan CE ve Ross JS, Co-downregulation of cell adhesion proteins alpha- and beta-catenins, p120CTN, E-cadherin, and CD44 in prostatic adenocarcinomas. Hum Pathol, 2001. 32(8): p. 849-55.
71. De Marzo AM, Knudsen B, Chan-Tack K ve Epstein JI, E-cadherin expression as a marker of tumor aggressiveness in routinely processed radical prostatectomy specimens. Urology, 1999. 53(4): p. 707-13.
72. Rubin MA, Mucci NR, Figurski J, Fecko A ve ark., E-cadherin expression in prostate cancer: a broad survey using high-density tissue microarray technology. Hum Pathol, 2001. 32(7): p. 690-7.
73. Ke B, Wu LL, Liu N, Zhang RP ve ark., Overexpression of stathmin 1 is associated

with poor prognosis of patients with gastric cancer. Tumour Biol, 2013. 34(5): p. 3137-45.

74. Hsu HP, Li CF, Lee SW, Wu WR ve ark., Overexpression of stathmin 1 confers an independent prognostic indicator in nasopharyngeal carcinoma. Tumour Biol, 2014. 35(3): p. 2619-29.

75. Nie W, Xu MD, Gan L, Huang H ve ark., Overexpression of stathmin 1 is a poor prognostic biomarker in non-small cell lung cancer. Lab Invest, 2015. 95(1): p. 56-64.