

Renal hücreli karsinomlarda immunohistokimyasal yöntemle saptanan FoxO1, anneksin 2 ve p53 ekspresyonunun klinikopatolojik parametreler ile ilişkisinin araştırılması

The investigation of the relationship between FoxO1, annexin 2 and p53 expressions detected by immunohistochemistry and clinicopathological parameters in renal cell carcinoma

Öz

Giriş: Bu çalışmanın amacı, FoxO1, Anneksin 2 ve p53'ün immunohistokimyasal ekspresyonlarının klinikopatolojik parametrelerle ilişkisini araştırıp, renal hücreli karsinom (RHK) gelişimindeki rollerini belirlemektir. **Gereç ve Yöntem:** On nonneoplastik böbrek dokusu ve 70 berrak hücreli RHK (BHRHK)'de immunohistokimyasal yöntemle FoxO1, Anneksin 2 ve p53 ekspresyonları incelendi. FoxO1, Anneksin 2 ve p53 ekspresyonları ve klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki yanı sıra bu belirleyiciler arasındaki korelasyon değerlendirildi. **Bulgular:** Anneksin 2 ve p53 ekspresyonları BHRHK olgularında nonneoplastik böbrek dokularına göre anlamlı olarak artmıştı ($p < 0,0001$, $p = 0,014$, sırasıyla). Nonneoplastik böbrek dokuları ile BHRHK arasında FoxO1 ekspresyonu açısından anlamlı bir fark yoktu ($p > 0,05$). Anneksin 2 ve p53 ekspresyonları yüksek nükleer dereceli ($p = 0,001$, $p < 0,0001$, sırasıyla) ve yüksek pT evreli ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$, sırasıyla) olgularda daha güçlüydü. Bu belirteçler ile lenfovasküler invazyon arasında da anlamlı ilişki bulduk ($p < 0,05$). FoxO1 ekspresyonu düşük nükleer dereceli ($p < 0,0001$) ve düşük pT evreli ($p = 0,001$) olgularda daha güçlüydü. FoxO1 ekspresyonu ile lenfovasküler invazyon arasında da anlamlı bir ilişki bulduk ($p < 0,05$). Ek olarak, BHRHK olgularında, Anneksin 2 ve p53 ekspresyonları ($p < 0,0001$, $r = 0,522$) arasında pozitif korelasyon, Anneksin 2 ve FoxO1 ekspresyonları ($p < 0,0001$, $r = -0,587$) yanısıra FoxO1 ve p53 ekspresyonları ($p < 0,0001$, $r = -0,690$) arasında da negatif korelasyon bulundu. **Sonuç:** Bulgularımız FoxO1, Anneksin 2 ve p53 ekspresyonlarının BHRHK'lerin diferansiyasyonu, progresyonu ve agresif davranışında rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, bulgularımızı doğrulamak ve bu belirteçlerin BHRHK gelişimindeki rolünü belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar kelimeler: Berrak hücreli renal hücreli karsinom, FoxO1, Anneksin 2, p53

Abstract

Objective: The aim of the present study was to investigate the immunohistochemical expressions of FoxO1, Annexin 2 and p53 in association with the clinicopathological parameters in order to define their roles in the development of renal cell carcinoma (RCC). **Materials and Methods:** Immunohistochemical analyse of FoxO1, Annexin 2 and p53 expressions were performed on the sections of 10 non-neoplastic kidney and 70 clear cell RCC (cRCC) tissues. The association between FoxO1, Annexin 2 and p53 expressions and the clinicopathological parameters as well as, the correlation between these markers were analysed. **Results:** The expressions of Annexin 2 and p53 were significantly higher in cRCC than the non-neoplastic kidney tissues ($p < 0,0001$, $p = 0,014$, respectively). There was not any significant difference between cRCC and non-neoplastic kidney groups regarding the expression of FoxO1 ($p > 0,05$). Annexin 2 and p53 expressions were significantly strong in cases with higher nuclear grade ($p = 0,001$, $p < 0,0001$ respectively) and pT stage ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ respectively). We also found significant association between expressions of these markers and

* Raşit Akdeniz,
** Şirin Başpınar,
** Sema Bircan,
** Nermin Karahan,
** Metin Çiriş,
** Kemal Kürşat Bozkurt,

* Muş Devlet Hastanesi, Patoloji
Laboratuvarı, Muş
* Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji
Anabilim Dalı, Isparta

Yazışma Adresi:
Uz. Dr. Raşit Akdeniz
Muş Devlet Hastanesi, Patoloji
Laboratuvarı, Muş
Telefon: 0506 899 27 81
Faks: 0436 212 13 60
e-mail: drrasitakdeniz@hotmail.com

lymphovascular invasion ($p<0,05$). FoxO1 expression was significantly strong in cases with lower nuclear grade ($p<0,0001$) and pT stage ($p=0,001$). There was a significant association between FoxO1 expression and lymphovascular invasion ($p<0,05$). In addition, a positive correlation was found between Annexin 2 and p53 expressions ($p<0,0001$, $r=0,522$). Furthermore a negative correlation was found between Annexin 2 and FoxO1 ($p<0,0001$, $r=-0,587$), as well as FoxO1 and p53 expressions ($p<0,0001$, $r=-0,690$) in cRCC cases. Conclusion: According to our results we suggest that FoxO1, Annexin 2 and p53 expressions may involve in differentiation, progression, and the aggressiveness of cRCC. However, further studies are needed to approve our findings and to clarify the role of these markers in the development of cRCC.

Keywords: Clear cell renal cell carcinoma, FoxO1, Annexin 2, p53

Giriş

Renal hücreli karsinom (RHK) günümüzde histolojik, sitogenetik ve moleküler çalışmaların sonucu olarak birbirinden ayrılabilen, morfolojik ve genetik özellikleri arasında sıkı ilişki olan bir tümör grubu olarak kabul görmektedir (1). Her iki cinste de böbrek kaynaklı malignitelerin %90'ını oluşturur (2). RHK'de sağ kalımı ön görmede en önemli faktör tümör evresidir. Tümör boyutu, histolojik alt tip ve nükleer derece prognostik önemi olan diğer parametrelerdir (3).

p53 geni, 53 kDa ağırlığında, 17. kromozomun kısa kolunda (17p13.1) yerleşen tümör baskılayıcı genidir (4). p53'ün hücre siklus regülasyonu, apoptoz, gelişim, farklılaşma, gen amplifikasyonu, DNA rekombinasyonu, kromozomal ayrışma ve hücre yaşlanma gibi olaylarda rolü olduğu gösterilmiştir (5,6). Pek çok malignitede p53 proteininin DNA'ya bağlanan kısmında değişiklikler yaratan mutasyonlar bildirilmiştir. Bu değişiklikler uygun bağlanmayı ve hücre siklus regülasyonunu önler ve kontrol edilemeyen hücre büyümesi ile proliferasyon ve maligniteye ilerlemeye yol açar (7). RHK'de p53'ün prognostik rolü tartışmalıdır (8,9). Bazı araştırmacılar p53'ün bu hastalarda, hastalısız yaşam için önemli bir belirleyici olduğunu savunmaktadırlar (8).

FoxO1 proteini, hücre proliferasyonu, hücre döngüsü progresyonu, diferansiyasyon, metabolizma, DNA hasar tamiri ve apoptoz mekanizmalarında görev alan ve bir transkripsiyon faktörü olan Fox (Forkhead box-containing protein, O-subfamily) ailesinin bir üyesidir (10). FoxO1 ekspresyonunda azalma, endometrium (11,12), meme (13), prostat (14) ve böbrek kanserlerinde (12,15) gösterilmiştir. FoxO1 ile RHK arasında karsinogenez ve prognoz açısından ilişki olduğu düşünülmekle birlikte bu konuda yapılmış çalışma sayısı çok azdır (16).

Annexinler, ilk olarak 1977'de keşfedilen

intraselüler membranlarla ilişkili bir grup protein ailesinin ortak ismidir (17). Hücre içerisinde hücre bölünmesi, apoptoz, veziküllerin taşınması, kalsiyum sinyalizasyonu ve büyüme regülasyonu gibi pek çok hücre fonksiyonları vardır. Annexinler, hücre şekli değişikliklerine çatı sağlamak gibi çeşitli hücre ve fizyolojik süreçlerde de rol alırlar (18,19). Hücre yüzeyindeki Annexin A2'nin, tümör invazyonu ve metastazında etkili olan proteazlar (katepsin B, plazminojen ve doku plazminojen aktivatörü) ve ekstrasellüler matriks proteinleri (tip 1 kollajen ve tenaskin C) için reseptör bağlayıcı protein olarak işlev gördüğü gösterilmiştir (20,21). Annexin 2 ekspresyonunun mide (22,23), meme (24,25), kolorektal karsinomlar (26), yüksek dereceli gliomlar (27) ve böbrek kanserlerinde (28,29) arttığı tespit edilirken, prostat adenokarsinomunda ekspresyon kaybı saptanmıştır (30,31).

RHK'de Annexin 2 ve p53 ekspresyonlarının arttığı, FoxO1 ekspresyonunun ise azaldığı az sayıda yapılan çalışmada gösterilmiştir (12,15,28,32). Fakat bu üç belirtecin birbiri ile ilişkisini inceleyen araştırma yoktur. Çalışmamızda bu üç belirtecin berrak hücreli RHK (BHRHK)'lerde ekspresyonlarını immunohistokimyasal yöntemle araştırıp, histopatolojik parametreler ve birbirleri arasındaki ilişkileri incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Olgu Seçimi

Çalışmaya Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2007-2012 yılları arasında tanı almış 70 BHRHK olgusu dahil edildi. Ayrıca nonfonksiyone böbrek nedeni ile rezeke edilen 10 adet böbrek dokusu kontrol grubu olarak kullanıldı. Olguların H&E boyalı preparatları arşivden çıkarılarak histolojik derece, patolojik tümör evresi

tekrar değerlendirildi. Olguların evresi 2002 TNM evreleme sistemi, derecesi Fuhrman dereceleme sistemine göre yapıldı.

İmmünohistokimyasal İnceleme

Seçilen parafin bloklardan immünohistokimyasal inceleme için lizimli lamlara 5 µm kalınlıkta kesitler alındı ve immünohistokimyasal FoxO1, Anneksin 2 ve p53 boyama işlemleri uygulandı. Negatif kontrol için kesitlere primer antikor yerine dilüent solüsyon damlatılarak immünohistokimyasal boyama işlemi yapıldı. FoxO1 için meme karsinomu, Anneksin 2 için malign melanom, p53 için kolon karsinomu pozitif kontrol olarak kullanıldı.

FoxO1: Tümör hücrelerinde nükleer boyanma pozitif olarak kabul edildi. Zhou ve arkadaşlarının (16) kullandığı yöntem modifiye edilerek, tümör hücrelerinde boyanma yoğunluğu ve boyanma oranı ayrı ayrı değerlendirildi. Değerlendirmeyi kolaylaştırma açısından, boyanma oranı %0=0, %1=1, %2-10=2, %11-30=3, %31-60=4, %61-100=5 olarak skorlandı. Boyanma yoğunluğu ise hiç boyanma yok=0, zayıf boyanma=1, orta derecede boyanma=2, kuvvetli boyanma=3 olarak skorlandı. Toplam skor (yoğunluk + boyanma oranı); hiç boyanma yoksa (-), 1-2 ise 1+, 3-8 ise 2+ olarak değerlendirildi.

Anneksin 2: Tümör hücrelerinde hiç boyanma yok = (-), sadece membranöz boyanma= 1+, membranöz ve sitoplazmik boyanma= 2+ olarak değerlendirildi (29).

p53: Tümör hücrelerinde nükleer boyanma pozitif olarak kabul edildi. Hiç boyanma yok = (-), %10'dan az boyanma = 1+, %10-50 arasında boyanma = 2+, %50'den fazla boyanma = 3+ olarak skorlama yapıldı (33,34).

İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel değerlendirmesi Windows için geliştirilmiş SPSS (statistical package for the social sciences) 18.0 paket programı ile yapıldı. FoxO1, Anneksin 2 ve p53 ekspresyon skorları ve klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki Pearson ki-kare ve Spearman korelasyon testleri ile değerlendirildi. Tümöral ve nontümöral dokuların boyanmaları arasında karşılaştırma Fischer's Exact Test ile yapıldı. p<0,05 değeri anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular

Klinik ve Histopatolojik Bulgular

Çalışmamız 70 BHRHK olgusu ve 10 nontümöral böbrek dokusunu içermektedir. Tablo 1'de görüldüğü gibi tümörlü olgularda ortalama yaş 62,8 ± 12,4 (34-86) iken tümörsüz olgularda ortalama yaş 43,6 ± 13,1 (21-80)'dir. Olguların 59'u (%84,2) radikal, 11'i (%15,7) parsiyel nefrektomi materyallerine ait olup bu materyallerin 42'si (%60) sağ, 28'i (%40) sol böbrek dokusuna aitti. Kontrol grubunun tamamı nonfonksiyone böbrek nedeni ile opere olan olgulara ait basit nefrektomi materyellerinden oluşmaktaydı.

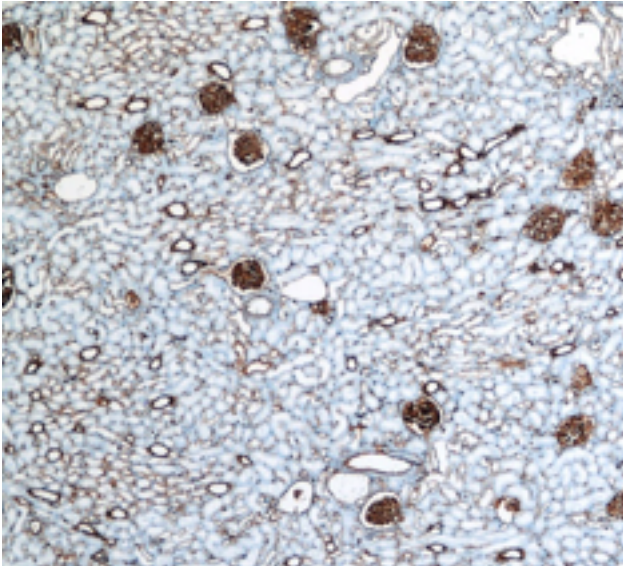
Tablo 1. BHRHK'lerin klinikopatolojik özellikleri

RHK	n=70
Cinsiyet	E 43 (%61,4)
	K 27 (%38,5)
Yaş ortalaması	62,8± 12,4 (34-86)
Yerleşim	Sağ 42 (%60)
	Sol 28 (%40)
pT evresi	pT1a 15 (%21,4)
	pT1b 28 (%40)
	pT2a 8 (%11,5)
	pT2b 3 (%4,3)
	pT3a 15 (%21,4)
	pT3b 1 (%1,4)
Nükleer derece (Fuhrman)	Derece 1 4 (%5,7)
	Derece 2 40 (%57,1)
	Derece 3 16 (%22,8)
	Derece 4 10 (%14,2)
Lenfovasküler invazyon	Var 8 (%11,4)
	Yok 62 (%88,6)
Tümör boyutu	≤4 cm 48 (%68,6)
	4-7 cm 18 (%25,7)
	>7 cm 4 (%5,7)
Perirenal yağ dokusu invazyonu	Var 10 (%14,2)
	Yok 60 (%85,8)
Renal sinüs invazyonu	Var 5 (%7,1)
	Yok 65 (%92,9)
Gerota fasyası invazyonu	Var 0 (%0)
	Yok 70 (%100)

İmmünohistokimyasal Bulgular

Anneksin 2 Ekspresyonu

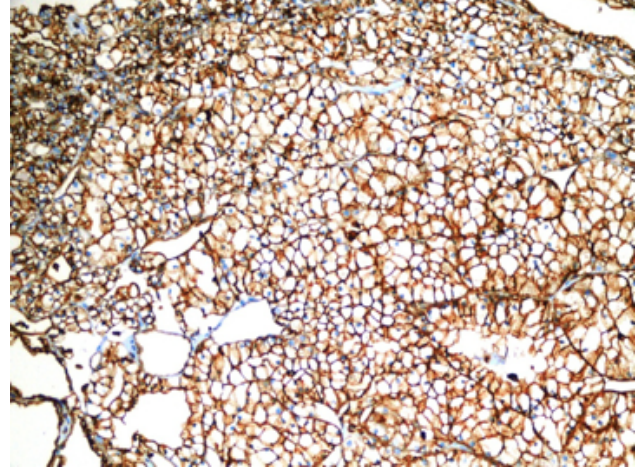
Anneksin 2 ile nonneoplastik böbrek dokusunda Bowman kapsülü, glomerüler yumak, distal tübüller, toplayıcı kanallar ve endotel hücrelerinde sitoplazmik ve membranöz boyanma saptanırken, proksimal tübüllerde boyanma izlenmedi (Şekil 1). Nonneoplastik böbrek dokularının 3 (%30)'ünde tümörlerin ise 68 (%97,1)'inde ekspresyon izlendi. Tümöral ve nontümöral olgular arasında Anneksin 2 ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (Fisher's Exact Test, $p < 0,0001$).



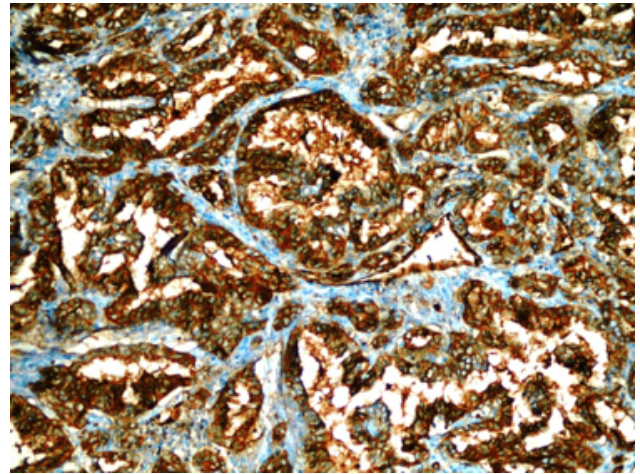
Şekil 1

BHRHK'de Anneksin 2 ekspresyon skoru ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki Tablo 2'de özetlenmiştir. Anneksin 2 ekspresyon skoru ile nükleer derece ve pT evresiarasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı (Pearson Ki kare, $p = 0,001$; $p < 0,0001$) (Tablo 2). Nükleer derecesi düşük olgularda membranöz boyanma (Şekil 2) izlenirken nükleer derecesi yüksek olgularda membranöz ve sitoplazmik boyanma (Şekil 3) saptandı. Bununla birlikte Spearman korelasyon testi ile Anneksin 2 ekspresyon skoru ile Fuhrman nükleer derecesi ve pT evresi arasında pozitif korelasyon saptandı (Spearman, $p < 0,0001$, $r = 0,798$; $p < 0,0001$, $r = 0,520$

sırasıyla). Ayrıca ekspresyon skoru ile lenfovasküler invazyon arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulundu ($p = 0,001$).



Şekil 2



Şekil 3

FoxO1 ekspresyonu

FoxO1 ekspresyonu, nontümöral böbrekte proksimal tübül hücrelerinde nükleer immünoreaktivite olarak saptandı (Şekil 4). Nontümöral olguların 9 (%90)'unda, tümöral olguların 54 (%77,2)'ünde nükleer boyanma saptandı. İki grup arasında FoxO1 ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Fisher's Exact Test, $p = 0,680$).

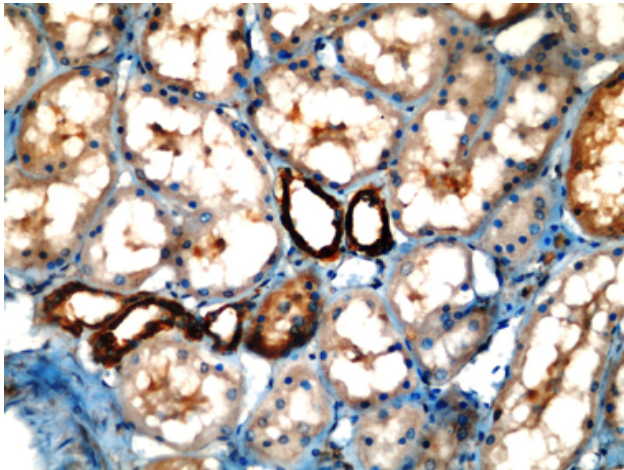
Tablo 2. BHRHK'de Anneksin 2 ekspresyon skoru ile klinikopatolojik parametrelerin ilişkisi

		Toplam	Anneksin 2 ekspresyon skoru			p
			(-) n (%)	1+ n (%)	2+ n (%)	
Cinsiyet	E	43	0 (0)	29 (67,4)	14 (32,6)	p=0,180
	K	27	2 (7,4)	18 (66,6)	7 (25,9)	
Yaş	<60	12	1 (8,3)	8 (66,6)	3 (25)	p=0,247
	≥60	58	1 (1,7)	39 (67,2)	18 (31)	
Fuhrman nükleer derece	Derece 1	4	1 (25)	3 (75)	0 (0)	p=0,001
	Derece 2	40	1 (2,5)	38 (95)	1 (2,5)	
	Derece 3	16	0 (0)	6 (37,5)	10 (62,5)	
	Derece 4	10	0 (0)	0 (0)	10 (100)	
pT Evresi	pT1	43	1 (2,3)	37 (86)	5 (11,6)	p<0,0001
	pT2	11	1 (9)	6 (54,5)	4 (36,3)	
	pT3	16	0 (0)	4 (25)	12 (75)	
	pT4	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Lenfovasküler invazyon	Var	8	0 (0)	1 (12,5)	7 (88,5)	p=0,001
	Yok	62	2 (3,2)	46 (74,1)	14 (22,5)	

ilişki (Pearson Ki kare, $p<0,0001$) ve iki parametre arasında negatif korelasyon saptandı ($p<0,0001$, $r=-0,638$). Nükleer derecesi yüksek olguların derecesi düşük olanlara göre daha az oranda boyanma gösterdiği izlendi (Şekil 5,6). Ayrıca FoxO1 ekspresyon skoru ile pT evresi arasında anlamlı bir ilişki bulundu (Pearson Ki kare, $p=0,001$). İki parametre arasında negatif korelasyon saptandı (Spearman $p<0,0001$, $r=-0,475$). Ekspresyon skoru ile lenfovasküler invazyon arasında da anlamlı bir ilişki saptandı ($p=0,015$).

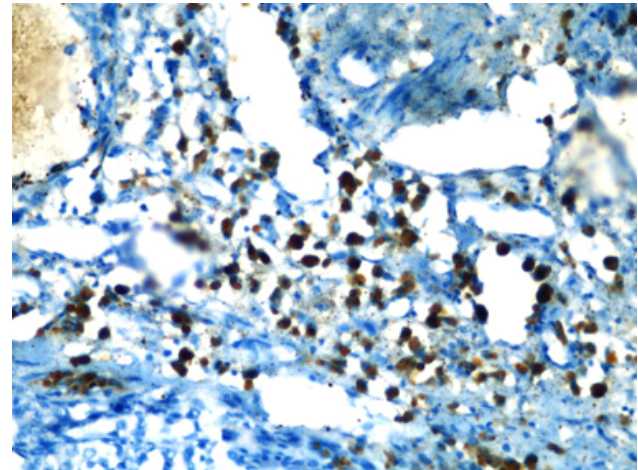
p53 ekspresyonu

Nontümöral olgularda p53 ekspresyonu izlenmedi (Şekil 7). Nükleer p53 ekspresyonu BHRHK'lerin 54'ünde (%77,2) saptandı. Tümöral ve nontümöral grupların p53 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu (Fisher's Exact Test $p=0,014$).



Şekil 4

BHRHK'de FoxO1 ekspresyon skoru ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki incelenmiş Tablo 3'te özetlenmiştir. FoxO1 ekspresyon skoru ile Fuhrman nükleer derece arasında istatistiksel olarak anlamlı



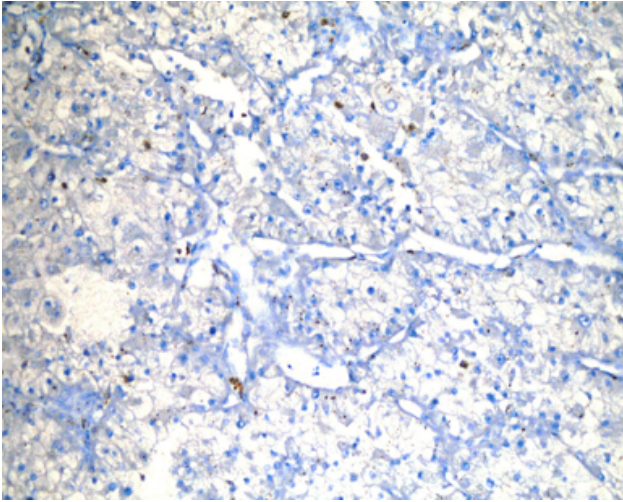
Şekil 5

Tablo 3. BHRHK'de FoxO1 ekspresyon skoru ile klinikopatolojik parametrelerin ilişkisi

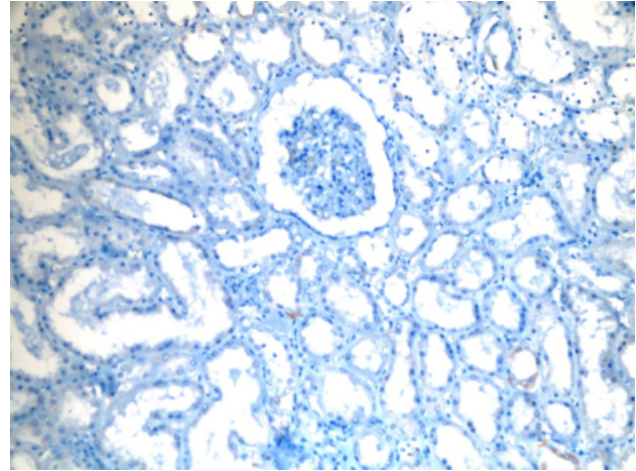
		Toplam	FoxO1 ekspresyon skoru			p
			(-) n (%)	1+ n (%)	2+ n (%)	
Cinsiyet	E	43	11 (25,5)	15 (34,8)	17 (39,5)	p=0,719
	K	27	5 (18,5)	9 (33,3)	13 (48,1)	
Yaş	<60	12	4 (33,3)	3 (25)	5 (41,6)	p=0,410
	≥60	58	12 (20,6)	21 (36,2)	25 (43,1)	
Fuhrman nükleer derece	Derece 1	4	0 (0)	2 (50)	2 (50)	p<0,0001
	Derece 2	40	3 (7,5)	10 (25)	27 (67,5)	
	Derece 3	16	5 (31,2)	10 (62,5)	1 (6,2)	
	Derece 4	10	8 (80)	2 (20)	0 (0)	
pT evresi	pT1	43	5 (11,6)	13 (30,2)	25 (58,1)	p=0,001
	pT2	11	2 (18,1)	5 (45,4)	4 (36,3)	
	pT3	16	9 (56,2)	6 (37,5)	1 (6,2)	
	pT4	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Lenfovasküler invazyon	Var	8	5 (62,5)	2 (25)	1 (12,5)	p=0,015
	Yok	62	11 (17,7)	22 (35,4)	29 (46,7)	

yüksek olguların derecesi düşük olanlara göre daha fazla oranda boyanma gösterdiği izlendi (Şekil 8,9)

p53 ekspresyon skoru ile pT evresi arasında anlamlı bir ilişki saptandı (Pearson Ki kare, $p<0,0001$). Ayrıca iki parametre arasında pozitif korelasyon bulundu (Spearman, $p<0,0001$, $r=0,600$). p53 ekspresyon skoru ile lenfovasküler invazyon arasında anlamlı ilişki saptandı ($p=0,003$).



Şekil 6

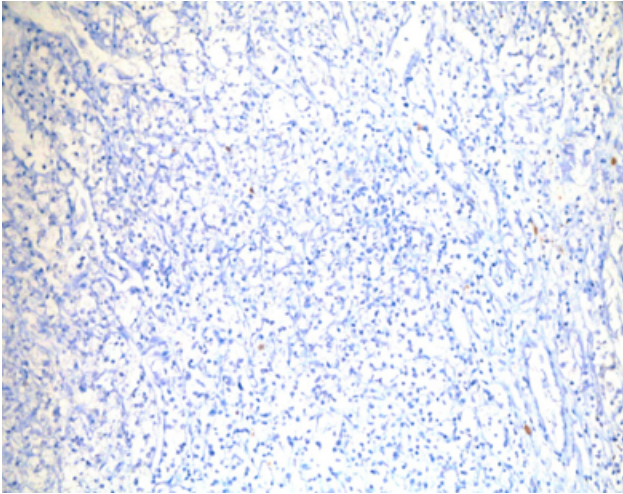


Şekil 7

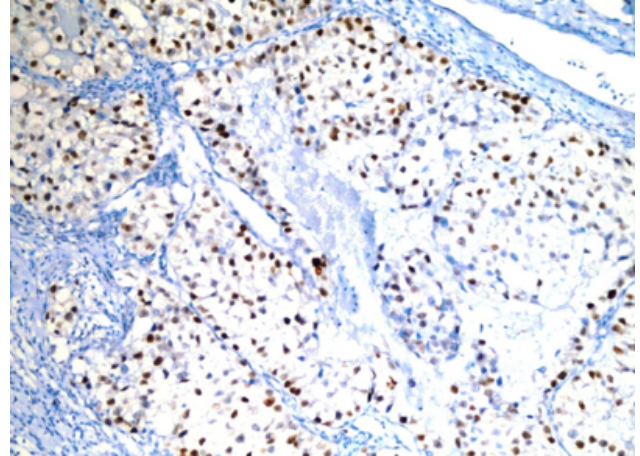
BHRHK'de p53 ekspresyon skoru ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki Tablo 4'te özetlenmiştir. p53 ekspresyon skoru ile nükleer derece arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki (Pearson Ki kare, $p<0,0001$) (Tablo 4) ve pozitif korelasyon saptandı (Spearman, $p<0,0001$, $r=0,770$). Nükleer derecesi

Tablo 4. BHRHK'de p53 ekspresyon skoru ile klinikopatolojik parametrelerin ilişkisi

		Toplam	p53 ekspresyon skoru				p
			(-) n (%)	1+ n (%)	2+ n (%)	3+ n (%)	
Cinsiyet	E	43	8 (18,6)	10 (23,2)	13 (30,2)	12 (27,9)	p=0,537
	K	27	8 (29,6)	7 (25,9)	8 (29,6)	4 (14,8)	
Yaş	<60	12	2 (16,6)	5 (41,6)	2 (16,6)	3 (25)	p=0,276
	≥60	58	14 (24,1)	12 (20,6)	19 (32,7)	13 (22,4)	
Fuhrman nükleer derece	Derece 1	4	2 (50)	2 (50)	0 (0)	0 (0)	p<0,0001
	Derece 2	40	14 (35)	14 (35)	11 (27,5)	1 (2,5)	
	Derece 3	16	0 (0)	1 (6,2)	8 (50)	7 (43,7)	
	Derece 4	10	0 (0)	0 (0)	2 (20)	8 (80)	
pT evresi	pT1	43	15 (34,8)	14 (32,5)	10 (23,2)	4 (9,3)	p<0,0001
	pT2	11	1 (9)	2 (18,1)	6 (54,5)	2 (18,1)	
	pT3	16	0 (0)	1 (6,2)	5 (31,2)	10 (62,5)	
	pT4	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Lenfovasküler invazyon	Var	8	0 (0)	1 (12,5)	1 (12,5)	6 (75)	p=0,003
	Yok	62	16 (25,8)	16 (25,8)	20 (32,3)	10 (16,1)	



Şekil 8



Şekil 9

İmmünohistokimyasal Belirleyiciler Arasındaki İlişki

Anneksin 2 ve FoxO1 ekspresyon skorları arasındaki ilişki incelendiğinde; iki belirleyici arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı (Pearson Ki kare, $p<0,0001$) (Tablo 5). Ayrıca ekspresyon skorları arasında negatif korelasyon saptandı (Spearman, $p<0,0001$, $r=-0,587$).

Tablo 5.BHRHK'de Anneksin 2 ve FoxO1 ekspresyon skorları arasındaki ilişki

	FoxO1 ekspresyon skoru			p	
	(-)	1+	2+		
	n (%)	n (%)	n (%)		
Anneksin 2 ekspresyon skoru	(-)	0 (0)	1 (50)	1 (50)	$p<0,0001$
	1+	5 (10,6)	13 (27,6)	29 (61,7)	
	2+	11 (52,3)	10 (47,6)	0 (0)	

FoxO1 ve p53 ekspresyon skorları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı (Pearson Ki kare, $p<0,0001$) (Tablo 6). Ayrıca ekspresyon skorları arasında negatif korelasyon bulundu (Spearman, $p<0,0001$, $r=-0,690$).

Tablo 6.BHRHK'de FoxO1 ve p53 ekspresyon skorları arasındaki ilişki

	p53 ekspresyon skoru				p	
	(-)	1+	2+	3+		
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)		
FoxO1 ekspresyon skoru	(-)	2 (12,5)	0 (0)	0 (0)	14 (87,5)	$p<0,0001$
	1+	2 (8,3)	4 (16,6)	16 (66,6)	2 (8,3)	
	2+	12 (40)	13 (43,3)	5 (16,6)	0 (0)	

Tablo 7.BHRHK'de Anneksin 2 ve p53 ekspresyon skorları arasındaki ilişki

	p53 ekspresyon skoru				p	
	(-)	1+	2+	3+		
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)		
Anneksin 2 ekspresyon Skoru	(-)	0 (0)	1 (50)	1 (50)	0 (0)	$p<0,0001$
	1+	15 (31,9)	15 (31,9)	13 (27,6)	4 (8,5)	
	2+	1 (4,7)	1 (4,7)	7 (33,3)	12 (57,1)	

Anneksin 2 ve p53 ekspresyon skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı (Pearson Ki kare, $p<0,0001$) (Tablo 7). Bununla birlikte ekspresyon skorları arasında pozitif korelasyon saptandı (Spearman $p<0,0001$, $r=0,522$).

Tartışma

Böbrek kanserleri tüm kanserlerin %2'sini oluşturmaktadır (35).RHK, her iki cinste de böbrek kaynaklı malignitelerin %90'ını oluşturur (2). Tüm erişkin maligniteleri arasında erkeklerde 12., kadınlarda 17. sıradadır. E/K oranı 1.5/1'dir (36). RHK, sıklıkla 40 yaşından sonra görülmektedir. 60-70 yaş arasında görülme sıklığı en üst düzeye ulaşmaktadır (37). Bizim çalışmamızda ortalama yaş $62,8 \pm 12,4$ (34-86) olup, erkek olguların sayısı daha fazlaydı.

RHK'de evre ve derecelendirme prognozu önemli ölçüde belirlemekle beraber, sağkalım için daha objektif parametrelere ihtiyaç vardır. Bu nedenle günümüze kadar çok sayıda potansiyel belirleyiciler araştırılmıştır. Bu belirleyicilerden olan Anneksinlerin hücre sinyal yolları, tümör invazyonu, hücre hareketliliği, metastaz, anjiogenez, apoptoz ve ilaç direnci gibi tümör oluşumu ve gelişiminde çeşitli rolleri vardır (38). Anneksinlerin tümörlere özgü ekspresyon paternleri vardır. Tanı, tedavi ve prognozu öngörmede potansiyel belirteçler olabilecekleri bildirilmiştir (38). Duncan ve arkadaşları (26) yapmış oldukları çalışmada kolorektal kanserlerde normal kolona göre Anneksin 2 ekspresyonunun arttığını kanıtlamışlardır. Literatürde RHK'de Anneksin 2 ekspresyonunu araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda RHK'de nontümöral böbrek dokusuna oranla daha yüksek Anneksin 2 ekspresyonu olduğu bildirilmiştir (29,39). Çalışmamızda literatür bilgileriyle uyumlu şekilde tümöral olgularda (%97,1) normal böbrek dokularına (%30) kıyasla daha yüksek oranda Anneksin 2 ekspresyonu saptandı. Ayrıca Zimmerman ve Ohno'nun çalışmaları ile (29,39) uyumlu

olarak çalışmamızda nükleer derecesi ve pT evresi yüksek olan olguların Anneksin 2 ile anlamlı olarak daha yüksek oranda şiddetli ekspresyon gösterdiklerini saptadık.

FoxO1 ekspresyonundaki azalmanın hücre döngüsünün kontrolünün ve apoptozun bozulmasına, dolayısı ile tümör oluşumuna sebep olduğu düşünülmektedir (12-15). Myatt ve arkadaşları (11) yapmış oldukları çalışmada, PCR ve Northern blot yöntemi ile normal endometriyum ve endometriyal kanserlerdeki FoxO1 ekspresyonlarını karşılaştırmışlardır. Malign olgularda FoxO1'in azaldığını tespit etmişler ve bunun onkogenin bir parçası olduğunu savunmuşlardır (11). Goto ve arkadaşları (40) da immunohistokimyasal yöntemle endometriyal adenokarsinomlarda normal endometriyuma göre FoxO1 ekspresyonunda azalma saptamışlardır (40). Zhou ve arkadaşları (16) çalışmalarında, RHK'nin farklı histolojik alt tiplerinde FoxO1 ekspresyon kaybının yaygın olduğunu ve özellikle berrak hücreli alt tipinde prognozun uygun bir habercisi olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmalarında nontümöral böbrekte %100, BHRHK'lerde %62,9 oranında FoxO1 ekspresyonu olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda nontümöral olguların %90'ında, tümöral olguların ise %77,2'sinde FoxO1 ekspresyonu izlendi. Tümörde ekspresyon oranında azalma izlenmekle birlikte iki grup arasında FoxO1 ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. Literatürde az sayıda bulunan çalışma ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda da nükleer derecesi ve pT evresi yüksek olan olguların FoxO1 ile daha zayıf ekspresyon gösterdiklerini saptadık. Bu bulgulara ek olarak, lenfovasküler invazyon gösteren olgularda da ekspresyon oranında azalma saptandı. Olgularımızın tamamının berrak hücreli tip olması nedeniyle FoxO1 ekspresyonu ve RHK'nin histolojik alt tipleri arasındaki ilişki hakkında yorum yapılamadı.

İnsan tümörlerinin en az %50'si tümör baskılayıcı gen olan p53'ün mutasyonlarını içerir. p53 geninin homozigot mutasyonu akciğer, meme ve kolon kanserleri başta olmak üzere birçok kanserin gelişimine ve kötü prognoza neden olur (41). BHRHK'lerde p53 aşırı ekspresyonunun prognozu olumsuz etkilediği belirtilmektedir (42). Girgin ve arkadaşları (8) 50 RHK olgusunda p53 ekspresyonunu pT evresi,

nükleer derece, histolojik alttip, tümör boyutu ile karşılaştırıp, prognoz ile ilişkisini değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında pT evresi, nükleer derece ve p53 ekspresyonunun önemli prognostik faktörler olduğunu tespit etmişlerdir. p53 eksprese eden olguların yaşam sürelerinin, etmeyenlere göre belirgin olarak azaldığı ileri sürülmüştür (8). Shvarts ve arkadaşları (32) 350 RHK olgusunda immunohistokimyasal yöntemle p53 ekspresyonunu araştırmışlar ve nefrektomi olmayan hastalarda p53 boyanması %20'nin üzerinde olanlarda tümör rekürrensini daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda RHK'lerde normal böbrek dokusuna oranla daha yüksek oranda p53 ekspresyonu saptanmıştır. Bu çalışmalarda p53 ekspresyon oranları %49-86 arasında bulunmuştur (43-45). Çalışmamızda nontümöral olguların hiçbirinde p53 ekspresyonu izlenmezken BHRHK'lerin %77,2'sinde nükleer p53 ekspresyonu saptandı. Literatür bulguları ile uyumlu olarak BHRHK'lerde daha yüksek oranda p53 ekspresyonu saptadık.

Noon ve arkadaşları (43) yapmış oldukları çalışmada p53 ekspresyonu gösteren RHK olgularında pT evresi ve nükleer derecenin daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Cho ve arkadaşları (44) da p53 pozitifliği ile prognostik parametreler arasında benzer sonuçlar bulmuştur. Diğer çalışmalarla uyumlu olarak çalışmamızda da nükleer derecesi ve pT evresi yüksek olan tümörlü olguların p53 ile daha yüksek oranda şiddetli ekspresyon gösterdiklerini saptadık. Bu bulgulara ek olarak, lenfovasküler invazyon gösteren olgularda da ekspresyon oranında artış saptandı.

Sonuç olarak çalışmamızda Anneksin 2 ve FoxO1'in nontümöral böbrek dokusunda ve BHRHK'lerde eksprese olduğunu saptadık. Anneksin 2 ekspresyonunun BHRHK'lerde nontümöral böbrek dokularına oranla daha yüksek olması, bu proteinin BHRHK'nin gelişiminde ve progresyonunda rol oynadığını düşündürmektedir. Bununla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamakla birlikte nontümöral böbrek dokusuna oranla tümörde FoxO1 ekspresyonunda azalma izlenmesi ise FoxO1'in tümör baskılayıcı olduğunu destekler niteliktedir. Bu bulgulara ek olarak nükleer derecesi ve pT evresi yüksek olan olguların Anneksin 2 ile daha güçlü, buna karşın FoxO1 ile daha zayıf ekspresyon gösterdiklerini saptadık. Aynı zamanda her iki belirleyici arasında

negatif korelasyon olduğunu bulduk. Literatürde bu iki belirteci beraber inceleyen çalışma bulunmamaktadır. Bu veriler ışığında Anneksin 2 ve FoxO1'in RHK'nin diferansiyasyonunda ve agresif davranışında da rol oynayabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda literatür bulguları ile uyumlu olarak nontümöral böbrek dokusunda p53 ekspresyonu izlenmezken, tümörlü olgularda %77,2 oranında saptadık. Aynı zamanda nükleer derecesi ve pT evresi yüksek olan tümörlü olguların p53 ile daha yüksek oranda şiddetli ekspresyon gösterdiklerini tespit ettik. Bu bulgulara ek olarak Anneksin 2 ekspresyonu ile arasında pozitif korelasyon, FoxO1 ekspresyonu ile arasında ise negatif korelasyon saptadık.

Günümüzde p53'ün RHK ve diğer organ malignitelerinde tümör gelişimi üzerine etkisi bilinmekle birlikte, iki önemli yeni immünohistokimyasal belirleyici olan Anneksin 2 ve FoxO1'in RHK'lerde tümör progresyonu, diferansiyasyonu ve agresif davranışı üzerine etkilerini araştıran çalışmalara ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz.

Kaynaklar

- Dal CP, Gaeta J, Huben R, Li FP, Prout GR, Sandberg AA. Renal cortical tumors. Cytogenetic characterization. *Am J Clin Pathol.* 1989; 92:408-414.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. Globocan Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. *Int. J. Cancer:* 2010; 127:2893-2917.
- Giberti C, Oneto F, Martorana G, Rovida S, Carmignani G. Radical nephrectomy for renal cell carcinoma: long-term results and prognostic factors on a series of 328 cases. *Eur Urol.* 1997; 31:40-48.
- Ribeiro Silva A, Ramalho LN, Garcia SB, Zucoloto S. The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. *Arch Pathol Lab Med.* 2003; 127:336-340.
- Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25(4): 177-181.
- Saint F, Le Frere Belda MA, Quintela R, Hoznek A, Patard JJ, Bellot J, Popov Z, Zafrani ES, Abbou CC, Chopin DK. Pretreatment p53 nuclear overexpression as a prognostic marker in superficial bladder cancer treated with Bacillus Calmette-Guerin (BCG). *Eur Urol.* 2004; 45(4): 475-482.
- Zhang L, Yu D, Hu M, Xiong S, Lang A, Ellis LM, et al. Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* 2000; 60:3655-3661.
- Girgin C, Tarhan H, Hekimgil M, Sezer A, Gürel G. p53 mutations and other prognostic factors of renal cell carcinoma. *Urol Int.* 2001; 66:78-83.
- Hofmoeckel G, Wittmann A, Dammrich J, Bassukas ID. Expression of p53 and bcl-2 in primary locally confined renal cell carcinomas: no evidence for prognostic significance. *Anticancer Res.* 1996; 16:3807-3811.
- Rena G, Guo S, Cichy SC, Unterman TG, Cohen P. Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J. Biol. Chem.* 1999; 274 (24): 17179-83
- Myatt SS, Wang J, Monteiro LJ, Christian M, Ho KK, Fusi L, et al. Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer. *Cancer Res* 2010; 70:367-377.
- Gan B, Lim C, Chu G, Hua S, Ding Z, Collins M, et al. FoxOs enforce a progression checkpoint to constrain mTORC1-activated renal tumorigenesis. *Cancer Cell* 2010; 18:472-484.
- Guttilla IK, White BA. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2009; 284:23204-23216.
- Dong XY, Chen C, Sun X, Guo P, Vessella RL, Wang RX, et al. FOXO1A is a candidate for the 13q14 tumor suppressor gene inhibiting androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer Res* 2006; 66:6998-7006.
- Kojima T, Shimazui T, Horie R, Hinotsu S, Oikawa T, Kawai K, et al. FOXO1 and TCF7L2 genes involved in metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2010; 49: 379-389.
- Zhou L1, Yin B, Liu Y, Hong Y, Zhang C, Fan J. Mechanism and Function of Decreased FOXO1 in Renal Cell Carcinoma. *Journal of Surgical Oncology* 2012; 105:841-847.
- Donnelly SR, Moss SE. Annexins in the secretory pathway. *Cell Mol Life Sci.* 1997; 53 (6): 533-8.
- Geisow M J, Walker J H, Boustead C, Taylor W. Annexins – a new family of Ca²⁺-regulated phospholipid-binding protein. *Biosci Rep.* 1987; (4): 289-98.
- Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking Ca²⁺

- signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.*2005; 6(6):449–61.
20. Mai J, Waisman DM, Sloane BF. Cell surface complex of cathepsin B/annexin II tetramer in malignant progression. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1477:215–230.
21. Diaz VM, Hurtado M, Thomson TM, Reventos J, Paciucci R. Specific interaction of tissue-type plasminogen activator (t- PA) with annexin II on the membrane of pancreatic cancer cells activates plasminogen and promotes invasion in vitro. *Gut* 2004; 53:993–1000.
22. Wang KL, Wu TT, Resetkova E, Wang H, Correa AM, Hofstetter WL, et al. Expression of annexin A1 in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome. *Clin Cancer Res* 2006; 12:4598–4604.
23. Wu CM, Lee YS, Wang TH, Lee LY, Kong WH, Chen ES, et al. Identification of differential gene expression between intestinal and diffuse gastric cancer using cDNA microarray. *Oncol Rep* 2006; 15:57–64.
24. Shen D, Nooraie F, Elshimali Y, Lonsberry V, He J, Bose S, et al. Decreased expression of annexin A1 is correlated with breast cancer development and progression as determined by a tissue microarray analysis. *Hum Pathol* 2006; 37:1583–1591.
25. Sharma MR, Koltowski L, Ownbey RT, Tuszynski GP, Sharma MC. Angiogenesis-associated protein annexin II in breast cancer: selective expression in invasive breast cancer and contribution to tumor invasion and progression. *Exp Mol Pathol* 2006; 81:146–156.
26. Duncan R, Carpenter B, Main LC, Telfer CT, Murray GI. Characterisation and protein expression profiling of annexins in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2008; 98:426–433.
27. Reeves SA, Chavez-Kappel C, Davis R, Rosenblum M, Israel MA. Developmental regulation of annexin II (lipocortin 2) in human brain and expression in high grade glioma. *Cancer Res* 1992; 52:6871–6876.
28. Genge BR, Wu LN, Wuthier RE. Differential fractionation of matrix vesicle proteins. Further characterization of the acidic phospholipid-dependent Ca²⁺-binding proteins. *J Biol Chem.*1990; 265(8):4703–10.
29. Zimmermann U, Woenckhaus C, Pietschmann S, Junker H, Maile S, Schultz K, et al. Expression of annexin 2 in conventional renal cell carcinoma is correlated with Fuhrman grade and clinical outcome. *Virchows Arch.* 2004; 445:368–374.
30. Hayes MJ, Moss SE. Annexins and disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 322:1166–1170.
31. Yee DS, Narula N, Ramzy I, Boker J, Ahlering TE, Skarecky DW, et al. Reduced annexin II protein expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2007; 131:902–908.
32. Shvarts O, Seligson D, Lam J, Shi T, Shi T, Horvath S, Figlin R, et al. p53 is an independent predictor of tumor recurrence and progression after nephrectomy in patients with localized renal cell carcinoma. *The Journal of Urology.* 2005; 173: 725-728.
33. Tuna B, Yorukoglu K, Tuzel E, Guray M, Mungan U, Kirkali Z. Expression of p53 and mdm2 and their significance in recurrence of superficial bladder cancer. *Pathol Res Pract.* 2003; 199: 323-328.
34. Pinto AE, Monteiro P, Silva G, Ayres JV, Soares J. Prognostic biomarkers in renal cell carcinoma: relevance of DNA ploidy in predicting disease-related survival. *Int J Biol Markers.* 2005; 20: 249-256.
35. Eble JN, Sauter G, et al: WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, Lyon, France, IARC Press, 2004.
36. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(2):74-108
37. Kovacs G. Molecular differential pathology of renal cell tumors. *Histopathology* 1993; 22:1-8.
38. Oh P, Li Y, Yu J, Durr E, Krasinska KM, Carver LA, et al. Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy. *Nature* 2004; 429:629–635.
39. Ohno Y, Izumi M, Kawamura T, Nishimura T, Mukai K, M Tachibana Annexin II represents metastatic potential in clear-cell renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer* 2009; 101, 287 – 294.
40. Goto T, Takano M, Albergaria A, Briese J, Pomeranz KM, Cloke B, et al. Mechanism and functional consequences of loss of FOXO1 expression in endometrioid endometrial cancer cells. *Oncogene* 2008; 27:9–19.
41. Ordonez NG, Rosai J. Urinary tract. In: Rosai J, ed. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology.* New York, Mosby 1996; 1145-1153.
42. Zigeuner R, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Langner C. Value of p53 as a prognostic marker in histologic subtypes of renal cell carcinoma: a systematic analysis of primary and metastatic tumor tissue. *Urology.* 2004; 63(4):651-5.

43. Noon AP1, Polański R, El-Fert AY, Kalirai H, Shawki H, Campbell F, Dodson A, Eccles RM, Lloyd BH, Sibson DR, Coupland SE, Lake SL, Parsons K, Vlatković N, Boyd MT. Combined p53 and MDM2 biomarker analysis shows a unique pattern of expression associated with poor prognosis in patients with renal cell carcinoma undergoing radical nephrectomy. *BJU Int.* 2012; 109(8):1250-7.
44. Cho DS, Joo HJ, Oh DK, Kang JH, Kim YS, Lee KB, Kim SJ. Cyclooxygenase-2 and p53 expression as prognostic indicators in conventional renal cell carcinoma. *Yonsei Med J.* 2005; 28:46(1):133-40.
45. Tomasino RM1, Morello V, Tralongo V, Nagar C, Nuara R, Daniele E, Curti M, Orestano F. p53 expression in human renal cell carcinoma: an immunohistochemical study and a literature outline of the cytogenetic characterization. *Pathologica.* 1994; 86(3):227-33.