



T.C.

RECEP TAYYİP ERDOĞAN

ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

TRANSÜRETRAL REZEKSİYON MATERYALLERİNDE

PROSTAT ADENOKARSİNOM İLE BENİGN TANI ALAN DİĞER OLGULARDA

P16, P21, P53 VE P57 EKSPRESYONUNUN İNCELENMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. MUHAMMET SAFA AYAZOĞLU

RİZE-2023



T.C.

RECEP TAYYİP ERDOĞAN

ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

TRANSÜRETRAL REZEKSİYON MATERYALLERİNDE

PROSTAT ADENOKARSİNOM İLE BENİGN TANI ALAN DİĞER OLGULARDA

P16, P21, P53 VE P57 EKSPRESYONUNUN İNCELENMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. MUHAMMET SAFA AYAZOĞLU

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. GÜLNAME FINDIK GÜVENDİ

RİZE-2023

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.

RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

Dr. Muhammet Safa AYAZOĞLU'na ait

“Transüretral Rezeksiyon Materyallerinde Prostat Adenokarsinom ile Benign Tanı Alan Diğer Olgularda p16, p21, p53 ve p57 Ekspresyonunun İncelenmesi” adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 13/02/2023

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Gülname FINDIK GÜVENDİ

Jüri Başkanı	Prof. Dr. Recep BEDİR Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı (Asıl Üye)
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Gülname FINDIK GÜVENDİ Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı (Asıl Üye)
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Hasan GÜÇER Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı (Asıl Üye)
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Oğuzhan OKCU Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı (Yedek Üye)
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Birgül TOK Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı (Yedek Üye)

Prof. Dr. Ömer ŞATIROĞLU

Dekan

TEŞEKKÜR

Öncelikle eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan annem ve babama teşekkür eder, ellerinden öperim. Eğitim süreci boyunca, tıpta uzmanlık eğitimi dışında bütün aşamalarda yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen ikiz kardeşim Dr. Mustafa Afşin AYAZOĞLU'na, uzmanlık eğitimi esnasında tanıştığım ve son birkaç yıldır bana hayat arkadaşlığı eden kızım Fâtıma'nın annesi refikam Dr. İlknur Merve AYAZOĞLU'na teşekkür ederim. Bu aşamaya gelene kadar her kademedede üzerimde emeği olan tüm hocalarıma, tıpta uzmanlık eğitiminde değerli deneyimlerinden yararlandığım, hocalarım Prof. Dr. Recep BEDİR, Doç. Dr. Hasan GÜÇER, Doç. Dr. Oğuzhan OKCU'ya ve bilhassa aynı zamanda tez danışmanım olan Doç. Dr. Gülname FINDIK GÜVENDİ'ye teşekkür ederim.

Bu Tıpta Uzmanlık Tezi Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Birimi tarafından TTU-2021-1287 numaralı bilimsel araştırma projesi olarak desteklenmiştir.

Dr. Muhammet Safa AYAZOĞLU

RİZE-2023

ÖZET

Amaç:

Prostat kanseri dünyada erkeklerde en sık görülen 2. kanser olup, ölüme sebep olan kanserler sıralamasında 5. sıradadır. Seksen yaş ve üstü erkeklerde prostat kanseri prevalansı % 59'a ulaşabilmektedir. Prostat spesifik antijen (PSA) prostat kanseri tanısında kullanılan bir serum belirteçidir. PSA değerleri, prostat kanseri tanısı almış hastalarda daha çok rekürrens veya metastazı belirlemede takipte kullanılan bir tetkiktir.

Prostat bezi, iç (transizyonel zon) ve dış (periferal ve santral zon) olmak üzere 2 bölümden oluşur. Prostat kanseri daha çok dış bölümden kaynaklanmaktadır. İç bölümde ise daha çok benign prostat hiperplazisi (BPH) geliştiği bilinmektedir. Transüretral rezeksiyon (TUR) ile prostat bezinin daha çok BPH'ın görüldüğü iç bölümünden örnekleme yapılmaktadır. TUR materyallerinde prostat kanseri tanısı aslında beklenmeyen bir durumdur. TUR; tümör düşünülen vakalarda tanı amaçlı yapılan bir işlem değildir. Bunun için Transrektal ultrasonografi eşliğinde (TRUS) prostat biyopsi tercih edilmekte ve tedavi ona göre planlanmaktadır. BPH olguları ve tedaviye cevap vermeyen nadir tümör vakalarında üretral semptomları düzeltmek için TUR yapılan bir işlemdir. Bu nedenle çalışmamızdaki prostat kanseri olgularının pek çoğu tesadüfen saptanmıştır. Çalışmamızda TUR materyallerinde prostat adenokarsinom (PKa) ile benign tanı alan diğer olgularda hücre siklusu inhibitörleri olan p16, p21, p53 ve p57'nin immunohistokimyasal (İHK) yöntemle boyanma paternini incelemek, bulguları karşılaştırmak, sonuçları değerlendirerek, bu ve benzeri çalışmalara ışık tutmak amaç edinilmiştir.

Gereç ve Yöntem:

Çalışmaya Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesinde 2014-2021 yılları arasında TUR materyallerinde PKa tanısı alan tüm olgular dahil edilmiştir. Diğer grup TUR materyallerinde nodüler hiperplazi ya da BPH tanısı alan olgular içinden rastgele seçilmiştir. Patoloji arşivinden bloklar çıkarılmış ve doku mikrodizileri (TMA) yöntemiyle yeni bloklar oluşturulmuştur. TMA yöntemi ile bloklardan 3 mm boyutlu korlar çıkarılıp haritalandırıldıktan sonra yeni bloklara ekim yapılmıştır. Bir kor kanser alanından ve bir kor da kanser çevresi benign alandan olmak üzere, PKa içeren her bir olgudan toplam 2 kor alınmıştır. Diğer grupta BPH olgularının her birinden bir kor alınmıştır. PKa olgularının bazılarının tamamının tümör olması veya benign alanın hiç bulunmaması nedeniyle, bu olgular istatistiksel analize dahil edilmemiştir. Sonuçta çalışmamızda kanser grubunda 107,

benign grupta 112 olmak üzere toplam 219 vaka yer almıştır. Oluşturulan blokların her birine p16 (anti-p16INK4a-E6H4), p21 WAF1/CIP1 (DCS-60.2), p53 (Bp53-11) ve p57/Kip2 (Kp 10)'den oluşan İHK paneli uygulanmış olup, PKa alanlarında, PKa alanları etrafındaki benign alanlarda ve BPH olgularında boyanma durumları karşılaştırılarak incelenmiş, sonuçlar pearson ki-kare yöntemiyle analiz edilerek istatistiksel anlamlılık araştırılmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri $p<0.05$ olan sonuçlar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Bulgular:

Kanser grubunda olguların ortalama yaşı 75.4 olup, BPH grubunda ise 68.9 olarak hesaplanmıştır. Kanser grubunda ortalama total PSA değeri 58.9, BPH grubunda ise 5.2'dir. Kanser grubunda en sık paternler; 45 olgu (%42) patern 3, 47 olguda (%44) patern 4 ve 15 olguda (%14) patern 5 olarak saptanmıştır. Olgular grade gruplarına göre sınıflandırıldığında; 29 olgu (%27) grade grup 1, 16 olgu (%15) grade grup 2, 13 olgu (%12) grade grup 3, 16 olgu (%15) grade grup 4 ve 33 olgu (%31) grade grup 5 olarak saptanmıştır. Olguların 27 tanesinde (%25) perinöral invazyon, 2 tanesinde (%2) nekroz ve 6 tanesinde (%6) anjiolenfatik invazyon izlenmiştir.

Kanser grubu, kanser çevresi benign alanlar ve BPH grubu olmak üzere 3 grupta İHK boyanma sonuçları karşılaştırılmıştır. Buna göre kanser alanlarında, kanser çevresi benign alanlar ve BPH olgularına göre p16 ve p21 daha yüksek boyanmıştır ($p<0.001$). Kanser alanlarında p53 ile mutasyonel boyanma daha çok görülmüştür ($p<0.001$). p57 ile gruplar arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p=0.386$). BPH olgularında kanser çevresi benign alanlara göre p16 boyanması daha yüksek saptanmıştır ($p<0.001$). Ayrıca BPH olgularında p53 ile mutasyonel boyanma daha fazla gözlenmiştir ($p=0.017$). Ancak gruplar arasında p21 ve p57 ile anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0.765$, $p=1$).

Kanser grubunda, olgu sayısındaki yetersizlik nedeniyle kombine skoru toplamı 7 olan grup 2 ve grup 3 olguları tek grupta birleştirilmiştir. Grup 4 olguları olgu sayısı azlığı nedeniyle istatistik analizine dahil edilmemiştir. Böylece grade grup 1, grup 2+3 ve grup 5 olmak üzere 3 grupta İHK boyanma durumları incelenmiştir. Kanser grubunda grade grup 5 olgularında grup 1 olgularına göre p16, p21 ve p57 ekspresyonu artmaktadır ($p<0.001$, $p=0.007$, $p<0.001$). p53 ile gruplar arasında anlamlı ilişki bulunmamaktadır ($p=0.203$). Grup 2+3 olgularında grup 1 olgularına göre p16 ekspresyonu daha yüksektir ($p=0.001$). Ancak

grup 1 olgularında p53 ile mutasyonel boyanma grup 2+3 ile göre daha çok görülmüştür ($p=0.034$). Gruplar arasında p21 ve p57 ile istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p=0.203$, $p=1$). Grup 5 olgularında grup 2+3 olgularına göre p57 ekspresyonu artmıştır ($p<0.001$). Ancak p16, p21 ve p53 ile gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p=0.321$, $p=0.157$, $p=0.395$).

Sonuç:

TUR materyallerinde PKa alanlarında, kanser çevresi benign alanlar ve BPH olgularına kıyasla p16, p21 ekspresyonu artmakta, p53 ile mutasyonel boyanma daha fazla görülmektedir. p57 ile gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadığından p57'nin kanseri inhibe eden etkisi İHK ile gösterilememiştir. Kanser alanlarına göre daha az olmasına rağmen kanser çevresi benign alanlarda da p16 ve p21 boyanmıştır. Dolayısıyla TUR materyallerinde PKa olgularında p16 ve p21 ile kansere spesifik boyanma izlenmemiştir. BPH olgularında kanser çevresi benign alanlara göre p16 ekspresyonu daha fazla olup, p53 ile mutasyonel negatif boyanan olgu sayısı daha yüksek bulunmuştur. BPH olgularında beklenmeyen şekilde görülen bu İHK boyanmanın sebebi Human Papilloma Virus (HPV) etkisine bağlı olabileceği düşünülmektedir.

PKa'da p21 ile p53'ün İHK olarak korele ekspresyon gösterip göstermediği incelenmiştir. Buna göre BPH olgularında ve PKa çevresi benign alanlarda İHK olarak korelasyonla uyumlu bulgular mevcuttur. Kanser alanlarında p53'ün wild tip boyanmasında p21 korelasyonuyla uyumlu bulgular vardır, ancak p53 mutasyonel boyanması ile p21 arasında korelasyon izlenmemiştir. Dolayısıyla TUR materyallerinde p53 ile mutasyonel boyanma gösteren PKa olgularında p21'i uyaran p53'ten bağımsız bir yolak olduğu düşünülmüştür.

p16 orta ve indifferansiye kanserlerde iyi diferansiye kanserlere göre daha yüksek ekspresyon göstermiştir. p16'ın yüksek dereceli tümörlerde şiddetli yoğunlukta boyanması nedeniyle, yüksek dereceli PKa tanısında AMACR'a alternatif bir İHK boya olabileceği düşünülmektedir. Ancak orta ve indifferansiye kanserler arasında p16 ile boyanma farklılığı bulunmamıştır. P21 ile sadece indifferansiye kanserler ile iyi diferansiye kanserler arasında boyanma farklılığı mevcuttur. İndifferansiye kanserlerde p21 daha yüksek boyanmıştır. p53 mutant pozitif olguların çoğu yüksek gradeli olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı

sonuç elde edilememiştir. Bunun nedeni çalışmamızda p53 ile negatif boyanmanın mutasyonel boyanma olarak kabul edilmesi ve p53 negatifliğinin de en çok grade grup 1 tümörlerde görülmüş olmasıdır. Bu nedenle indifferansiye kanserler ile iyi ve orta diferansiye kanserler arasında p53 ile istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık görülmemiştir. İyi diferansiye kanserlerde orta diferansiye tümörlere göre p53 mutasyonel boyanması daha çok izlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızda PKa olgularında, p53 mutasyonel boyanmasının yüksek grade tümör ile ilişkisi istatistiksel olarak gösterilememiştir. İndifferansiye kanserlerde iyi ve orta diferansiye kanserlere kıyasla p57 ekspresyonu daha yüksek bulunmuştur. Bu nedenle TUR materyallerinde PKa olgularında p57'nin kanserde baskılayıcı rolü İHK olarak desteklenememiştir. Tam tersine daha yüksek boyanması p57'nin indifferansiye PKa'da farklı bir mekanizma ile uyarıldığını düşündürmüştür. Bu açıdan daha çok çalışma yapılması ihtiyacı bulunmaktadır.

PKa'da p16 ile orta şiddette ve üzerinde pozitif boyama yapan ve p53 ile negatif boyanma gösteren olgular HPV ile ilişkili olabilir. Ancak moleküler test ihtiyacı olduğundan teyit edilememiştir.

Anahtar kelimeler: Prostat kanseri, p16, p21, p53 ve p57

ABSTRACT

Aim:

Prostate cancer is the 2nd most common cancer in men in the world, and it ranks 5th among cancers that cause death. The prevalence of prostate cancer in men aged 80 years and older can reach % 59. Prostate specific antigen (PSA) is a serum marker used in the diagnosis of prostate cancer. PSA values are a test used in follow-up to detect recurrence or metastasis in patients diagnosed with prostate cancer.

The prostate gland consists of two parts, inner (transitional zone) and outer (peripheral and central zone). Prostate cancer mostly originates from the outer part. It is known that mostly benign prostatic hyperplasia (BPH) develops in the inner part. With transurethral resection (TUR), sampling is made from the inner part of the prostate gland, where BPH is more common. The diagnosis of prostate cancer in TUR materials is actually an unexpected situation. TUR; It is not a diagnostic procedure in cases where tumor is considered. Transrectal ultrasonography guided prostate biopsy (TRUS) is preferred for this and the treatment is planned accordingly. TUR is a procedure to improve urethral symptoms in BPH cases and rare cases of tumors that do not respond to treatment. Therefore, most of the prostate cancer cases in our study were found by chance. In our study, it was aimed to examine the staining pattern of cell cycle inhibitors p16, p21, p53 and p57 with the immunohistochemical (IHC) method in prostate adenocarcinoma (PCa) and other cases with benign diagnosis in TUR materials, to compare the findings, to evaluate the results and to shed light on these and similar studies.

Material and Method:

All cases diagnosed as PCa in TUR materials at Recep Tayyip Erdogan University Faculty of Medicine between 2014 and 2021 were included in the study. The other group was randomly selected from cases diagnosed with nodular hyperplasia or BPH in TUR materials. Blocks were removed from the pathology archive and new blocks were created using the tissue microarray (TMA) method. After 3 mm cores were extracted and mapped from the blocks with the TMA method, new blocks were planted. A total of 2 cores were taken from each case with PCa, one core from the cancer area and one core from the benign area around cancer. In the other group, one core was taken from each of the BPH cases. Because some of the PCa cases were all tumors or had no benign areas, these cases were not

included in the statistical analysis. As a result, a total of 219 cases, 107 cases in the cancer group and 112 cases in the benign group, were included in our study. IHC panel consisting of p16 (anti-p16INK4a-E6H4), p21 WAF1/CIP1 (DCS-60.2), p53 (Bp53-11) and p57/Kip2 (Kp 10) was applied to each of the blocks created. Statistical significance was investigated by comparing the staining status in the surrounding benign areas and BPH cases, and the results were analyzed with the Pearson chi-square method. Results with a statistical significance value of $p < 0.05$ were considered significant.

Results:

The mean age of the cases in the cancer group was 75.4, and it was calculated as 68.9 in the BPH group. The mean total PSA value was 58.9 in the cancer group and 5.2 in the BPH group. The most common patterns in the cancer group; pattern 3 was found in 45 cases (42%), pattern 4 in 47 cases (44%), and pattern 5 in 15 cases (14%). The most common patterns in the cancer group; Pattern 3 was found in 45 cases (42%), pattern 4 in 47 cases (44%), and pattern 5 in 15 cases (14%). Perineural invasion was observed in 27 (25%) of the cases, necrosis in 2 (2%) and angiolymphatic invasion in 6 (6%) cases.

IHC staining results were compared in 3 groups: cancer group, benign areas around cancer and BPH group. Accordingly, p16 and p21 were stained higher in cancer areas compared to benign areas around cancer and BPH cases ($p < 0.001$). Mutational staining with p53 was more common in cancer areas ($p < 0.001$). There was no significant relationship between p57 and the groups ($p = 0.386$). There was no significant relationship between p57 and the groups ($p = 0.386$). In addition, mutational staining with p53 was observed more in BPH cases ($p = 0.017$). However, there was no significant relationship between the groups with p21 and p57 ($p = 0.765$, $p = 1$).

In the cancer group, group 2 and group 3 cases with a combined score of 7 were combined into a single group due to the insufficient number of cases. Group 4 cases were not included in the statistical analysis due to the small number of cases. Thus, IHC staining status was examined in 3 groups: grade group 1, group 2+3 and group 5. In the cancer group, p16, p21 and p57 expression were increased in grade group 5 cases compared to group 1 cases ($p < 0.001$, $p = 0.007$, $p < 0.001$). There was no significant relationship between p53 and the groups ($p = 0.203$). In group 2+3 cases, p16 expression was higher than in group 1 cases ($p = 0.001$). However, mutational staining with p53 was more common in group 1 cases than

with group 2+3 ($p=0.034$). There was no statistically significant difference between the groups with p21 and p57 ($p=0.203$, $p=1$). In group 5 cases, p57 expression was increased compared to group 2+3 cases ($p<0.001$). However, there was no significant difference between the groups with p16, p21 and p53 ($p=0.321$, $p=0.157$, $p=0.395$).

Conclusion:

In TUR materials, p16, p21 expression is increased in PCa areas compared to benign areas around cancer and BPH cases, and mutational staining with p53 is more common. Since there was no significant difference between p57 and the groups, the cancer-inhibiting effect of p57 could not be demonstrated by IHC. Although it is less than cancer areas, p16 and p21 stained in benign areas around cancer. Therefore, no cancer-specific staining with p16 and p21 was observed in PCa cases in TUR materials. In BPH cases, p16 expression was higher than in benign areas around cancer, and the number of cases with mutational negative staining with p53 was found to be higher. It is thought that the reason for this IHC staining, which is unexpectedly seen in BPH cases, may be due to the effect of Human Papilloma Virus (HPV).

It was investigated whether p21 and p53 correlated expression as IHC in PCa. Accordingly, there are findings consistent with the correlation as IHC in BPH cases and benign areas around PCa. There are findings consistent with the p21 correlation in the wild-type staining of p53 in cancer areas, but no correlation was observed between p53 mutational staining and p21. Therefore, it was thought that there is a p53-independent pathway that stimulates p21 in PCa cases with mutational staining with p53 in TUR materials.

p16 showed higher expression in intermediate and undifferentiated cancers than in well-differentiated cancers. Because p16 stains with high intensity in high-grade tumors, it is thought that it may be an alternative IHC stain to AMACR in the diagnosis of high-grade PCa. However, no difference in p16 staining was found between intermediate and undifferentiated cancers. There is a difference in staining between p21 and only undifferentiated cancers and well-differentiated cancers. p21 stained higher in undifferentiated cancers. Although most of the p53 mutant positive cases were high grade, statistically significant results could not be obtained. The reason for this is that negative staining with p53 is considered as mutational staining and p53 negativity is mostly seen in grade group 1 tumors in our study. Therefore, there was no statistically significant difference

with p53 between undifferentiated cancers and well and moderately differentiated cancers. In well-differentiated cancers, p53 mutational staining was more common than in moderately differentiated tumors. Therefore, in our study, the relationship between p53 mutational staining and high grade tumor could not be shown statistically in PCa cases. p57 expression was found to be higher in undifferentiated cancers compared to well and moderately differentiated cancers. Therefore, the suppressive role of p57 in cancer in PCa cases in TUR materials could not be supported as IHC. On the contrary, its higher staining suggested that p57 is stimulated by a different mechanism in undifferentiated PCa. More work is needed in this respect.

Cases with moderate and above positive staining with p16 and negative staining with p53 in PCa may be associated with HPV. However, it could not be confirmed due to the need for molecular testing.

Keywords: Prostate cancer, p16, p21, p53, p57

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
TABLolar DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
Prostat Bezinin Embriyolojisi.....	2
Prostat bezinin Anatomisi	2
Prostat bezinin zonal anatomisi.....	3
Prostat bezinin histolojisi.....	4
Prostat hipertrofi ve hiperplazisi.....	5
Prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN).....	6
Prostatik karsinom	6
Prostatik karsinom epidemiyolojisi.....	6
Prostatik karsinomun klinik özellikleri	6
Prostatik karsinomun mikroskopisi.....	7
Gleason derecelendirme sistemi.....	8
Kribriform morfoloji.....	11
Gleason skorum sistemi.....	12
Tersiyer grade ve minör tersiyer grade.....	12
Gleason skor kategorizasyonu.....	13
Prostat adenokarsinomu tanısında immunohistokimya.....	15
İntraduktal karsinom	16

Hücre siklus regülatörleri / Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (p16, p21, p53 ve p57)	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
Olguların seçimi.....	20
Olguların biyokimyasal ve patolojik verilerinin toplanması.....	21
Histopatolojik değerlendirme ve parafin blok seçimi	21
Doku mikrodizileri (Tissue microarray) yöntemi	21
TMA yöntemiyle parafin blokların hazırlanması.....	22
İmmunohistokimyasal Boyanma Yöntemi	24
İmmunohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesi	25
Verilerin istatistiksel analizi	29
4. BULGULAR	30
5. TARTIŞMA.....	37
6. SONUÇ.....	46
7. KAYNAKLAR.....	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

PKa: Prostat adenokarsinom

UGS: Ürogenital sinüs

BPH: Benign prostat hiperplazisi

H&E: Hemotosilen-eozin

PSA: Prostat spesifik antijen

DHT: Dihidrotestosteron

IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü

HPV: Human Papilloma Virus

PIN: Prostatik intraepitelyal neoplazi

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

ICD-O-3.2: Uluslararası Onkolojik Hastalıklar Sınıflaması 3. Edisyon 2. revizyonu

ISUP: Uluslararası Ürolojik Patoloji Grubu

GUPS: Genitoüriner Patoloji Topluluğu

İHK: İmmünohistokimya

HK: Histokimya

TRUS: Transrektal ultrasonografi eşliğinde prostat biyopsi

HMWCK: Yüksek molekül ağırlıklı sitokeratin

AMACR: Alfa Metilaçil Koa Rasemaz

DNA: Deoksiribonükleik asit

CDK: Siklin bağımlı kinaz

RB: Retinoblastom

WAF-1: Yabanıl tip p53 ile aktive edilmiş fragman 1

TUR: Transüretral rezeksiyon

TMA: Doku mikrodizileri

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Prostat bezinin anatomisi (11)

Şekil 2. McNeal tarafından tanımlanan prostat bezinin zonal anatomisi (2)

Şekil 3. Nodüler hiperplazi veya BPH olgusunun histopatolojik görüntüsü (H&E x40, x100)

Şekil 4. PKa morfolojik görüntüsü (H&E x200, x400)

Şekil 5. Uluslararası Ürolojik Patoloji Grubunun (ISUP) 2014 yılında tanımlamış olduğu son Gleason şeması (25)

Şekil 6. PKa olgusunda kribriform morfoloji (H&E x100)

Şekil 7 ve 8. PKa olgularında çeşitli Gleason kombine skora sahip tümörlerin morfolojik görüntüsü (H&E x100)

Şekil 9. Hücre döngüsü (35)

Şekil 10. HPV ile enfekte hücrede p16'da görülen ekspresyon artışının mekanizması (37)

Şekil 11. p21 ve p57 proteinlerinin hücre siklus regülasyon mekanizması (41, 42)

Şekil 12. Olguların yeni blokta temsil edildiği korların haritalandırılarak kaydedilmesi

Şekil 13. TMA yöntemiyle hazırlanan 15 blok ve bu bloklardan elde edilen H&E boyalı lamalar

Şekil 14. TMA yöntemiyle hazırlanan 15 bloktan elde edilen toplam 60 adet İHK boyalı lamalar

Şekil 15. Nodüler hiperplazi veya BPH olgularında İHK olarak p16 ile boyanma durumu (İHK x100)

Şekil 16. PKa olgularında İHK olarak p16 ile boyanma durumu (İHK x100)

Şekil 17. Nodüler hiperplazi veya BPH olgularında İHK olarak p21 ile boyanma durumu (İHK x100)

Şekil 18. PKa olgularında İHK olarak p21 ile boyanma durumu (İHK x100)

Şekil 19. Nodüler hiperplazi veya BPH olgularında İHK olarak p53 ile boyanma durumu (İHK x100)

Şekil 20. PKa olgularında İHK olarak p53 ile boyanma durumu (İHK x100)

Şekil 21. Nodüler hiperplazi veya BPH olgularında İHK olarak p57 ile boyanma durumu (İHK x100)

Şekil 22. PKa olgularında İHK olarak p57 ile boyanma durumu (İHK x100)



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Dünya sağlık örgütünün (DSÖ) 2022 yılında yayınladığı prostat tümörleri sınıflaması (21)

Tablo 2. Gleason skor kategorizasyonu (28)

Tablo 3. Grup BT ile grup B’de yer alan olgulardaki yaş ve total prostat spesifik antijen (PSA) durumu

Tablo 4. Grup BT’de yer alan malign olgulardaki bazı prognostik değişkenlerin dağılımı

Tablo 5. Uygulanan İHK panelde grup BT içerisinde yer alan benign ve malign korlar arasındaki boyanma durumlarının karşılaştırılması

Tablo 6. Uygulanan İHK panelde grup BT içerisinde yer alan malign korlar ile grup B içerisinde yer alan benign olgular arasındaki boyanma durumlarının karşılaştırılması

Tablo 7. Uygulanan İHK panelde grup BT içerisinde yer alan benign korlar ile grup B içerisinde yer alan benign olgular arasındaki boyanma durumlarının karşılaştırılması

Tablo 8. Grade gruplar arasında uygulanan İHK paneldeki boyanma durumu

Tablo 9. Grade grup 1, grup 2+3 ve grup 5 olguları arasında İHK panel boyanma durumu

Tablo 10. Grup BT’de malign korlarda yer alan grade grup 1, grup 2+3 ve grup 5 tümörleri arasında İHK olarak p16 ve p21 boyanma durumunun karşılaştırılması

Tablo 11. Grup BT’de malign korlarda yer alan grade grup 1, grup 2+3 ve grup 5 tümörleri arasında İHK olarak p53 ve p57 boyanma durumunun karşılaştırılması

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Prostat kanseri erkeklerde akciğerden sonra en çok görülen ikinci kanserdir. Ölüme sebep olan kanserler arasında ise beşinci sıradadır (1). Prostat kanseri gelişiminde patofizyolojik açıdan en çok hormonal faktörler üzerinde durulmakla beraber, son zamanlarda farklı teoriler öne sürülmektedir.

Prostat kanseri, prostat bezinin en çok periferik kısmında görülmektedir. Periüretal bölgeden ise daha çok nodüler hiperplazi geliştiği bilinmektedir (2). TUR materyalinde bazen beklenmedik şekilde prostat kanseri saptanabilmektedir. Öncesinde kanser olduğu bilinen vakalar dışında bu durum klinisyen için aslında beklenmeyen bir durumdur. TUR operasyonu genellikle benign prostat dokularında semptomların şiddetini azaltmak için (dizüri, noktürü, vs.) uygulanan bir yöntemdir. Daha önce prostat kanseri tanısı almış olgularda tıkanma bulgusu olmadan genelde tercih edilen bir yöntem değildir. Çalışmamızda olguların çoğunluğuna insidental olarak prostat kanseri tanısı verilmiştir (3).

Bu araştırma için daha önce literatürdeki çalışmalarda yer alan hücre siklus inhibitörleri tercih edilmiş, bunlar içerisinde p16, p21, p53 ve p57 proteinleri belirlenmiştir. Bu proteinlerin malign ve benign alanlardaki boyanma durumları İHK yöntem kullanılarak araştırılmıştır. Olgular hazırlanırken TMA yöntemi kullanılmış, bu yöntem daha farklı bir metod uygulanarak yapılmıştır.

Kanser grubunda 107 olgu, benign grupta 112 olgu olmak üzere toplam 219 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Kanser grubunda yer alan iyi diferansiye, orta diferansiye ve indiferansiye tümörler arasında hücre siklus inhibitör proteinleri boyanma durumları yönünden anlamlı bir farklılık olup olmadığı araştırılmak istenmiştir.

Çalışmamızda benign grup ile malign grup, kanser olgularının periferinde yer alan benign prostat dokuları ile benign-malign grup ve malign grup içerisindeki farklı grade grup tümörler arasında İHK boyanma paternini incelemek, bulguları karşılaştırmak, sonuçları değerlendirerek, bu ve benzeri çalışmalara ışık tutmak amaç edinilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Prostat Bezinin Embriyolojisi:

Erkek cinsiyet farklılaşması, fetal testis tarafından üretilen androjenlerin etkisi altında meydana gelir. Erkek yönünde cinsiyet farklılaşması, androjenlerin Wolf kanallarını stabil halde tutması ve testiküler Sertoli hücrelerinden eksprese edilen Anti-Müllerian hormonun etkisi ile Müllerian kanalların regresyonu sonucu oluşur (4).

Kloaka, ilkel arka bağırsak ve urakal allantoisin bir genişlemesidir. Urakal allantois embriyoda oluşan atıkların uzaklaştırıldığı bir kanaldır. Kloaka, gebeliğin 28. gününde ürogenital septum tarafından ayrılmaya başlar. Bunun sonucundan gebeliğin 44. gününde ürogenital sinüs (ÜGS) ve rektum olarak 2 kısma ayrılır. Prostat bezi ÜGS'den gelişir (5).

Erkek embriyosunda prostat bezi, konnektif dokunun çevrelediği proksimal üretra epitelinden köken alan çok sayıda tomurcuktan kaynaklanır. Bu tomurcuklar yaklaşık olarak gestasyonun 8. haftasında histolojik olarak tanımlanabilir ve 11. haftada gözle görülür hale gelebilir (6). Bu tomurcuklar en sonunda cinsel olgunlaşmadan ve ejakülat hacminin yaklaşık %20'sinin oluşumundan sorumlu karmaşık bir salgı ağının dallarını oluşturur (7). Tomurcuklar ayrıca erkek üretrasının geri kalanında da bulunur ve burada bulboüretral (Cowper) bezleri ve Littre üretral bezlerini oluştururlar. Kaudal Müllerian kanal kalıntılarının epitelyal-mezenkimal dönüşüme uğradığı, ürogenital sinüs mezenkimiyle birleştiği ve üretranın bu özel bölgesinde prostat gelişimini etkileyebileceği Chai ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca Wolf kanalları erkeklerde proksimal üretrada sonlanır ve prostat gelişiminde de rol oynayabilir. Levine ve arkadaşlarına göre insan fetüsünde prostat gelişimi proksimal üretral tomurcuklardan kaynaklanır. Testesteron salınımı buradaki epitelyal hücrelerde gerçekleşir (8, 9).

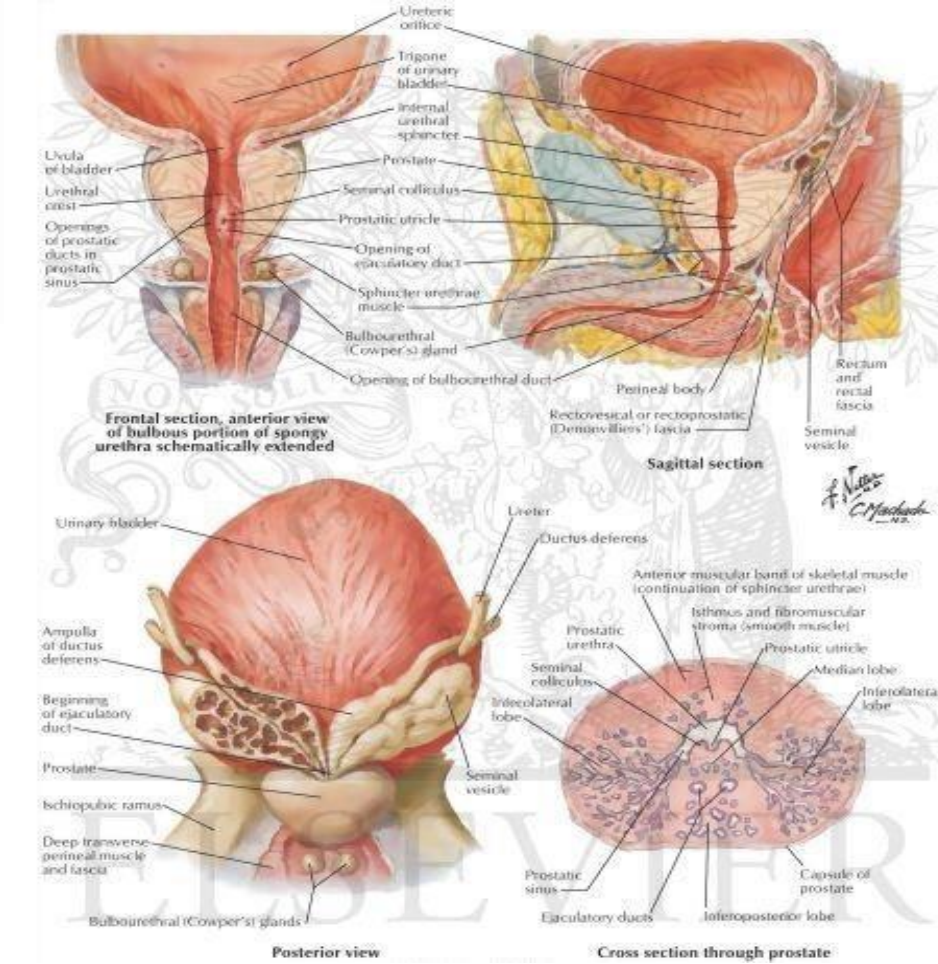
Prostat bezinin Anatomisi

Prostat bezi prostatik üretrayı çevreler halde yukarıda mesane boynu, aşağıda ürogenital diyafram arasında yer alan erkek üreme sisteminin dış genital organlarından biridir. Arka yüzünde rektum ön duvarı ile komşudur. Ön ve yan yüzlerinde mesane çevresi yağlı dokular yer alır. Bezin lümeninde ejakülatör duktusun açıldığı ostium yer alır. Prostat salgıları en son aşamada buradan prostatik üretraya iletilmektedir. Prostat bezinin arka yüzünde yaklaşık olarak bez ile mesane kesişme lokalizasyonunda bilateral olarak izlenen seminal vezikül bezleri yer almaktadır. Seminal vezikül bezlerinin hemen yanında bilateral olarak duktus deferens duktusları izlenir (Şekil 1).

Testis ve epididim rete testis aracılığı ile birbirine bağlanır. Kıvrıntılı duktus yapısındaki epididim testisin yaklaşık olarak arka yüzünde yer alır. Epididim daha sonra düzleşerek duktus deferens olarak devam eder. Duktus deferens mesaneye doğru devam ederken mesane arka yüzünde üreter ile çaprazlaşır. Bu çaprazlaşmadan sonra seminal vezikül bezlerinin yanındaki yerini alır. Sonraki aşamada seminal vezikül ve duktus deferens duktusları ejakülatör duktus vasıtasıyla prostat bezi lümenine ulaşır (10).

Prostat bezinin zonal anatomisi

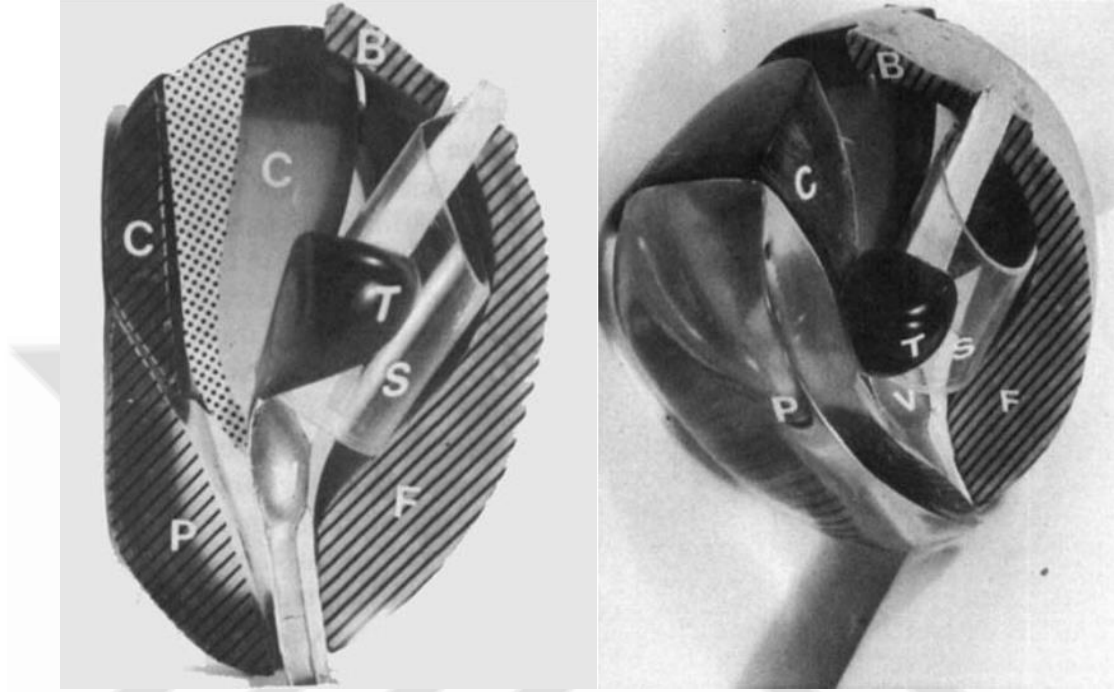
Prostat bezi ters çevrilmiş koni şeklinde olup tabanı mesane boynu proksimalinde ve apeksi ürogenital diyaframın distaline yakın bir yerde bulunur. Prostat bezi santral zon, periferik zon, anterior fibromusküler stroma ve periüretral zonun yer aldığı preprostatik bölge olmak üzere dört zona ayrılır (Şekil 2).



Şekil 1. Prostat bezinin anatomisi (11)

Periferik zon en büyük bölgedir. Prostat glandüler dokusunun büyük kısmı bu zonda yer alır. Preprostatik bölgede yer alan transizyonel zon hiperplaziden en çok etkilenen

kısımdır. Daha anlaşılır bir deyişle prostat bölümleri, iç (transizyonel zon) ve dış (periferik ve santral zon) olarak da ayrılabilir. İç kısımda BPH daha çok görülür, dış kısımda karsinom daha sıktır (2).



Şekil 2. McNeal tarafından tanımlanan prostat bezinin zonal anatomisi izlenmektedir (2). B: Mesane boynu, C: Santral zon, F: Anterior fibromüsküler stroma, P: Periferik zon, S: Sfinkter, T: Transizyonel zon, V: Verumontanum

Prostat bezinin histolojisi

İnsan prostat glandüler epiteli asinüs ve duktuslardan meydana gelir. Bu asinüs ve duktuslarda luminal, bazal ve nöroendokrin olmak üzere 3 tip hücre vardır (12,13). Çoğu olguda prostat glandularında papiller görünüm mevcuttur.

Luminal hücreler kolumnar şekilli olup, hücrenin tabanına yakın yerleşimli yuvarlak nükleusları vardır. Şeffaf sitoplazmaya sahiptir. Luminal hücreler gland lümenine sekresyon ürünlerini salgılar ve seminal sıvı oluşumuna katkıda bulunur. PSA bu ürünlerden biridir ve İHK olarak PSA ile bu luminal hücreler pozitif boyanırlar (12,14).

Bazal membranın bitişiğinde bazal hücreler görülür. Bu hücreler belirsiz sitoplazmalı ve oval nükleusludur. Nöroendokrin hücreler rutin H&E kesitlerde çoğunlukla görülmez ancak İHK olarak varlıkları kanıtlanmıştır (12).

Prostat bezinin fibromuskuler bir stroması vardır. Bu stromada geniş düz kas hücreleri, fibroblast, kan damarları ve sinirler ile karışık halde izlenir. İnsan prostat bezinde adipoz doku görülmez (12).

Prostat hipertrofi ve hiperplazisi

BPH yaşlı erkeklerde en sık görülen hastalıklar arasındadır. Görülme sıklığı yaşla birlikte artmakta olup 4. dekatta bulunan erkeklerin %30-40'ında görülebilir. Bu oran 8.dekatta %70-80'lere ulaşır (15).

Hastaneye başvurular alt üriner sistem semptomları nedeniyle olur. Sık sık idrar yapma isteği, nokturi yani gece idrara çıkma ihtiyacı ve idrar inkontinansı (idrara kaçırma) bu semptomlardan bazılarıdır.

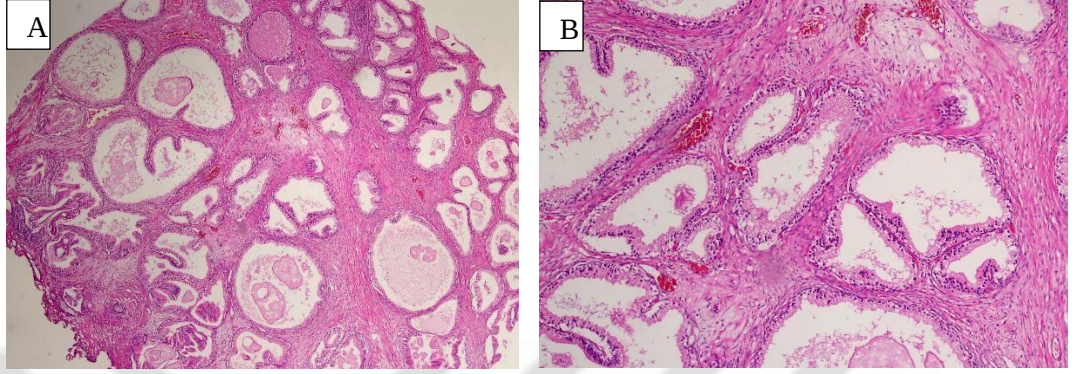
Prostat bezinin büyümesi diğer iç salgı bezlerinde olduğu gibi hormonlar ve büyüme faktörleri nedeniyle olur. En önemli uyarıcı faktör testosterondur. Testosteron 5 alfa redüktaz enzimi ile dihidrotestosterona (DHT) dönüşür, DHT de prostat stromal hücrelerinde proliferasyonu uyarır (15, 16). İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF) reseptörü, insan hücre membranında bulunan bir proteindir. Prostat bezinin büyümesinde etkili olan diğer bir yolak, büyüme faktörlerinin etkisi ile IGF reseptörünün uyarılmasıdır. IGF reseptörü uyarılması sonucunda prostat bezi stroma hücrelerinde proliferasyon gelişir. Aşırı büyümenin önlenmesi amacıyla kullanılan ilaçlardan Finasterid DHT'yi, Metformin ise IGF reseptörünü antagonize ederek stimülasyonu inhibe eder (15).

Periüretral alanda prostat glandüler elemanlarının ve fibroblastların çoğalması hastalarda semptomlar oluşturur. Semptomatik BPH hastalarında prostat volümü en az 20 ml olarak saptanmıştır (17). Yaş, sedanter yaşam tarzı, sigara, alkol kullanımı, hipertansiyon, tip 2 diyabet vs. BPH için bilinen risk faktörlerinden bazılarıdır.

Hastalık esas olarak hormonal dengesizlik nedeniyle epitel ve stromadaki hücre ölümü ve proliferasyon arasındaki dengenin bozulması sonucu oluşur. Human Papilloma Virus (HPV) muhtemel diğer bir neden olarak bildirilmiştir (18). Her iki durum sıklıkla birlikte bulunsun da nodüler hiperplazili hastaların artmış prostat kanseri geliştirme riski taşıdığını gösteren inandırıcı bir bulgu yoktur (19).

Histopatolojik olarak BPH'de görülen epitelyal hiperplazi, bazal ve sekretuar hücreler ile döşeli, değişken boyutlarda glandüler yapılardan oluşan nodüler lezyonlar ile karakterizedir. Sıklıkla korpora amilasea, bazen kalsifikasyon içeren dilate glandüller vardır.

Glandları oluşturan sekretuar hücreler, merkezde lokalize nükleuslu, belirsiz nükleoluslu, pembe soluk sitoplazmalı kolumnar şekilli hücrelerdir. Stromal nodül ise yuvarlak oval nükleuslu, açık kromatinli masum görünümde içsi hücrelerden oluşur (Şekil 3).



Şekil 3. Noduler hiperplazi veya BPH olgusunun histopatolojik görüntüsü A) H&E x40, B) H&E x100

Prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN)

PKa öncüsü lezyondur. Normal glandlara kıyasla daha iri ve hiperkromatik görünümlü nükleuslara sahip, selüler kalabalıklaşmanın izlendiği daha kompleks görünümlü lezyonlardır. Düşük ve yüksek gradeli olmak üzere ikiye ayrılır. Yüksek gradeli PIN’da düşük gradeli PIN’a kıyasla daha belirgin hücresel kalabalıklaşma, tabakalanma artışı ve nükleol belirginliği vardır.

Prostatik karsinom

Prostatik karsinom epidemiyolojisi

Prostat kanseri erkeklerde en çok görülen kanser sıralamasında akciğer kanserinden sonra ikinci sıradadır. Dünyada erkeklerde en çok öldüren kanserler sıralamasında ise beşinci sıradadır. Prostat kanser insidansı ve mortalite oranı ile hasta yaşı arasında kuvvetli bir ilişki vardır. 65 yaş üstü yaşlı erkeklerde prostat kanseri insidansı en yüksektir. Afrikalı-Amerikan erkeklerde prostat kanseri insidansı beyaz erkeklere göre daha yüksektir, klinik gidiş daha kötüdür (1).

Prostatik karsinomun klinik özellikleri

Prostat kanseri lokal ileri olgular ve metastatik olgular hariç olmak üzere genellikle asemptomatiktir. Semptomatik olgularda spesifik olmayan alt üriner sistem şikayetleri görülür. Digital rektal muayene ile prostat sertliği ve büyüklüğü incelenir.

Prostat kanseri genellikle periferik zondan gelişir; ancak prostat karsinomu olgularının %15-20 kadarında transizyonel zondan gelişebileceği bildirilmiştir (20). Bu nedenle PSA yüksekliği olan, digital rektal muayenesinde malignite yönünde bulgu izlenmeyen olgularda bu durum dikkate alınmalıdır.

Prostatik karsinomun mikroskopisi

Prostatik karsinom, karsinom olması sebebiyle epitelyal bir tümör olup adenokarsinomdur. Primer prostat kanserleri en sık adenokarsinom morfolojisinde izlenir. Adenokanser dışında prostat bezinin daha farklı hücre türünde primer ve metastatik kanserleri tanımlanmıştır. Prostat bezinin epitelyal tümörleri Dünya sağlık örgütünün (DSÖ) 2022 sınıflaması ile belirtilmiştir (21) (Tablo 1).

Tablo 1. Dünya sağlık örgütünün (DSÖ) 2022 yılında yayınladığı prostat tümörleri sınıflaması (21)

Prostat bezinin epitelyal tümörleri

Prostat bezinin glandüler neoplazileri

8440/0*	Kistadenom
8148/2	Prostatik intraepitelyal neoplazi, yüksek dereceli
8500/2	İntraduktal karsinom
8140/3	Asiner adenokarsinom
8490/3	Taşlı yüzük hücreli benzeri asiner adenokarsinom
8140/3	Pleomorfik dev hücreli asiner adenokarsinom
8572/3	Sarkomatoit asiner adenokarsinom
8140/3	Prostatik intraepitelyal neoplazi benzeri karsinom
8500/3	Duktal adenokarsinom
8574/3	Tedavi ilişkili nöroendokrin prostatik karsinom

Prostat bezinin skuamöz neoplazileri

8560/3	Adenoskuamöz karsinom
8070/3	Skuamöz hücreli karsinom
8147/3	Adenoid kistik (bazal hücreli) karsinom

Prostat bezine özgü mezenkimal tümörler

Prostat bezinin stromal tümörleri

8935/1	Malignite potansiyeli belirsiz stromal tümör
8935/3	Stromal sarkom

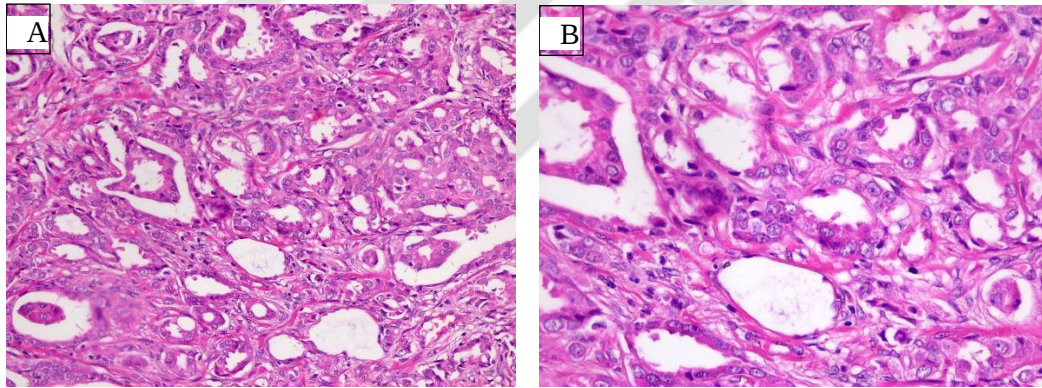
*Patolojik tanı kodları Uluslararası Onkolojik Hastalıklar Sınıflaması 3. edisyon 2. revizyonundan (ICD-O-3.2) alınmıştır.

PKa mikroskopik olarak normal prostat bezlerine göre daha küçük boyutlu infiltratif görünümde glandlardan oluşur (22). Bu karsinom; küçük büyütme denilen x40 büyütmede

gland / stroma oranı artmış, yani gland yoğunluğunun fazla olduğu alanları temsil etmektedir. Ayrıca malign glandlar etrafında desmoplastik stroma dikkati çeker.

Bu alanlar daha büyük büyütmede incelendiğinde infiltratif glandları oluşturan hücreler iri hiperkromatik nükleuslu, belirgin nükleolusludur. Nükleolus hem büyük hem de kırmızı renklidir ve bu bulgu malignite yönünde önemlidir. Benign glandlarda görülen girintili çıkıntılı-papiller benzeri lümen özelliği malign glandlarda izlenmez, ayırıcı bir şekilde düzdür (Şekil 4).

Benign glandlarda normal histolojinin gereği olarak görülen, bazal membran bitişiğinde izlenen, bazal veya miyoepitelyal hücreler malign glandlarda görülmez (22). PKa'da nekroz, lenf damarlarına invazyon ve sinir invazyonu görülebilir. Bu bulgular hastalığın seyri yani prognozu açısından önemlidir (23, 24). PKa vakalarında bu bulguların varlığı kötü prognozla ilişkili bulunmuştur. PKa'da tümörün derecelendirilmesi Gleason derecelendirme sistemine göre yapılır.

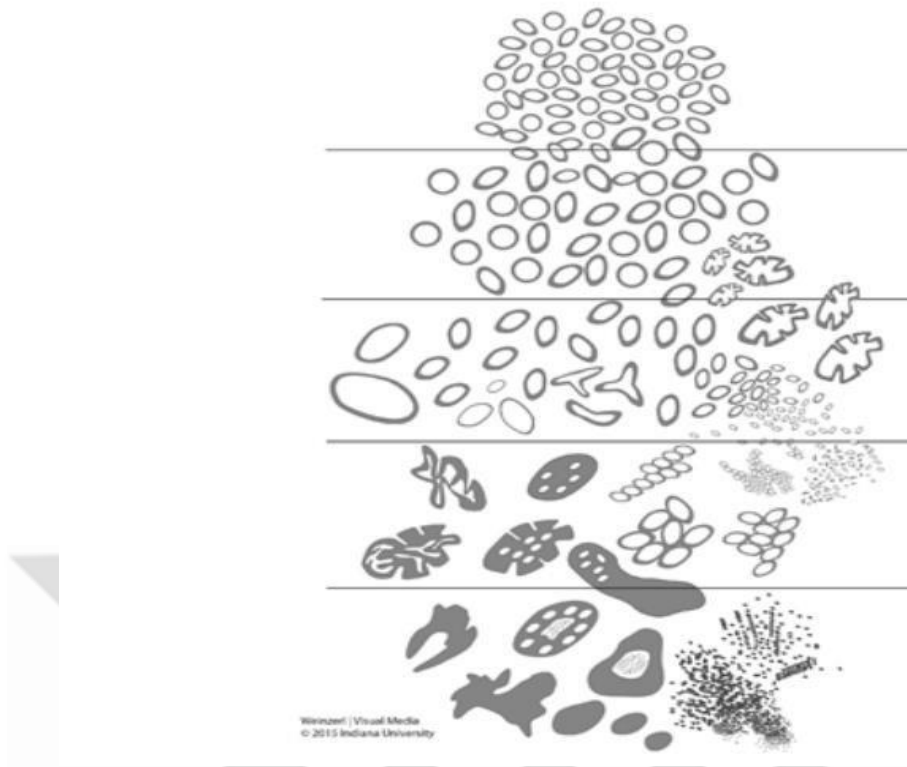


Şekil 4. PKa morfolojik görüntüsü A) Glandüler arşitektüre sahip, iri hiperkromatik nükleuslu bazıları belirgin nükleuslu, amfofilik sitoplazmalı atipik epitel hücrelerinden oluşan infiltratif tümör izlenmektedir (H&E x200). B) Daha büyük büyütmede tümörün sitolojik atipisi daha net görülmektedir. Tümör hücrelerinin bazılarında kırmızı renkli nükleol belirginliği mevcuttur (H&E x400).

Gleason derecelendirme sistemi

Her tümörde olduğu gibi prostat kanserlerinde de hastalığın seyri, prognozu ve tedavi yanıtını etkilediğinden tümörün derecelendirilmesi gerekir. PKa'da grade, Gleason derecelendirme sistemine göre belirlenir.

Bu sistemde tümörler oluşturdukları morfolojik paterne göre skorlanır ve gruplandırılırlar (Şekil 5).



Şekil 5. Uluslararası Ürolojik Patoloji Grubunun (ISUP) 2014 yılında tanımlamış olduğu son Gleason şeması (25)

Gleason derecelendirme sistemi ilk defa 1966 yılında Dr. Donald Gleason tarafından tanımlanmıştır (26). Devam eden süreçte PKa'daki morfolojik paternler şematize edilerek gruplara ayrılmıştır. Bu şematik gruplama 2005 yılında ISUP tarafından yeniden tanımlanmıştır. En son 2014 yılında yine ISUP tarafından son kez düzenlenmiş olup, bu son düzenleme daha sonra DSÖ'nün 2016 yılındaki genitoüriner sistem kanserleri sınıflamasında yer almıştır.

Son dönemlerde faaliyet gösteren diğer bir grup olan Genitoüriner Patoloji Topluluğu (GUPS), Gleason derecelendirmesi konusunda yaptığı kapsamlı araştırma, anket ve değerlendirme sonuçlarını 2020 yılında yayınladığı makale ile açıklamıştır (27). Bu çalışma Gleason skorlaması konusunda yapılmış son kapsamlı araştırmalardan biri olduğu için önemlidir.

Gleason derecelendirme sistemi kanserin sitolojik özelliklerinden çok yapısal özelliklerini temel alan bir sistemdir. Burada bahsedilen kanserin yapısal özellikleri, ön

planda büyüme paterni ve glandüler farklılaşmanın derecesidir. Işık mikroskopunda bu paternlerin sağlıklı değerlendirilmesi için x40 veya x100'lük büyütme tercih edilmelidir.

Patern 1: Çok iyi sınırlı veya keskin sınırlı nodüllerdir. Nodülü oluşturan bezler birbirlerine oldukça benzeyen boyut ve şekilde bezler olup, aradaki stroma dardır (28). Gleason ilk tanımlandığı yıllarda bazal hücre belirleyicileri yoktu. Günümüzde İHK olarak bazal hücre belirleyicilerinin yaygın kullanımı ile bu paterni oluşturan glanların periferinde bazal hücrelerin bulunduğu tespit edilmektedir. Bu nedenle bu lezyonların adenozis tipinde benign lezyonlar olduğu düşünülmektedir (28). Dolayısıyla Gleason tarafından tanımlanan bu patern günümüzde kullanılmamaktadır.

Patern 2: Patern 1'den küçük nüanslarla ayrılmaktadır. Yine iyi sınırlı bir nodüler lezyondur. Lezyonun periferinde fokal odaklarda minimal düzensiz alanlar izlenebilir. Nodülü oluşturan bezler aynı patern 1'de olduğu gibi boyut ve şekil bakımından birbirine benzer, aradaki stroma biraz daha geniştir. Patern 2 tümörler gerçekte var olan ve genellikle transizyonel zondan gelişen çok iyi diferansiye tümörlerdir (28). Transrektal ultrasonografi eşliğinde prostat biyopsileri (TRUS) prostat bezinin periferik kısmından örnekleme yaptığından, TRUS biyopsilerinde görülen tümörlere patern 2 tanımlaması yapmak uygun değildir.

Patern 3: Rutin tıbbi patoloji pratiğinde tümörleri derecelendirmeye patern 3'ten başlanmaktadır (25). Patern 3'te iyi oluşmuş bir nodül görülmez. Bezler stroma içerisinde gelişigüzel bir infiltrasyon gösterir. İnfiltrasyon her yöne olabildiği gibi arada kalan stroma dar veya geniş olabilir. Grade 3'te en önemli koşul, tümörü oluşturan bezlerin tek tek ve ayrı ayrı görülüyor olmasıdır. Dolayısıyla bezlerin iyi gelişmiş olması gereklidir. Patern 3 tümörler iyi diferansiye tümörlerdir.

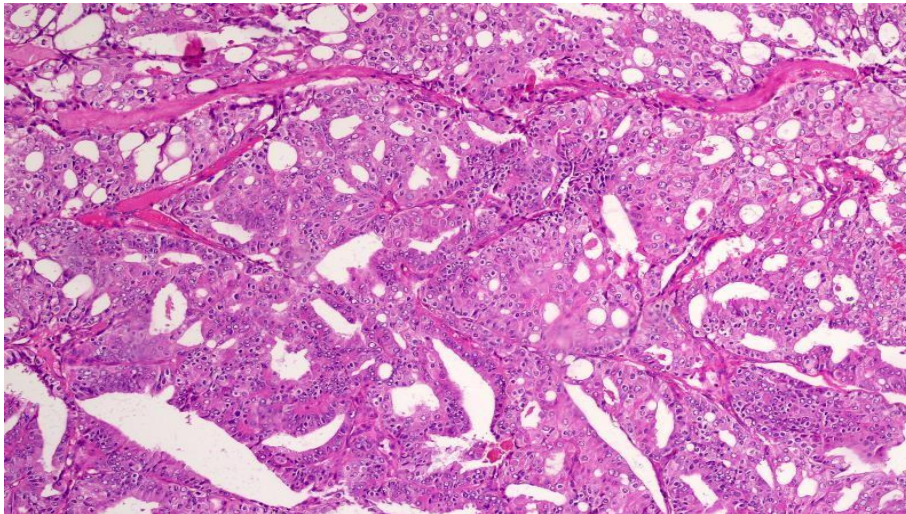
Patern 4: Patern 3'ten farklı olarak daha ölümcül olabilen tümörlerdir. Farklı morfolojik varyasyonlar vardır. Gelişimini tamamlamamış, küçük çaplı (abortif) bezler görülebilir. Buradaki bezlerin lümenleri görülebilir, ancak bez sınırları patern 3'te olduğu gibi kalem ile rahatlıkla çizilemez. Birbiriyle birleşen ve konfluent tabakalanma oluşturan bezler diğer bir morfolojik varyasyondur. Bu tabakalanma içerisinde minimal de olsa stroma görülebilir. Bir başka patern 4 morfolojisi kribriform yapılardır. Bu morfolojide tabakalanma

oluşturan tümör hücre proliferasyonu ve arada zimba ile delinmiş gibi boşluklar görülür (29). Son patern 4 morfolojisi glomerüloid yapıdır. Bunlar dilate bir bez lümeninde bulunan, bu bez duvarına tek bir yerden bağlı kribriform nitelikte tümör hücre proliferasyonudur. Morfolojik olarak böbrek glomerül yapısına benzediği için glomerüloid yapı olarak tanımlanmıştır (29).

Patern 5: Bu paternde glandüler farklılaşma bir istisna durum haricinde görülmez. Bu istisna durum; ortasında komedo nekrozu bulunan, kribriform yapıda bezlerin oluşturduğu tabakalar halinde infiltrasyon gösteren tümör hücre proliferasyonudur. Glandüler farklılaşmanın olmadığı paternler ise; solid adalar ve tek tek hücreler-hücre kordonlarından oluşan tümör hücre proliferasyonlarıdır.

Kribriform morfoloji

Son dönemde üzerinde en çok çalışılan paternlerden biri patern 4'te yer alan kribriform morfolojidir. Yapılan çalışmalarda kribriform morfolojiye sahip tümörlerin daha kötü prognozlu olduğu saptanmıştır (30). Bu çalışmalarda yapılan analizler sonucunda kribriform morfolojinin görülmesi biyokimyasal nüksüz sağkalım, metastazsız sağkalım, hastalığa spesifik sağkalım ve genel sağkalım açısından olumsuz bir bağımsız prognostik faktör olarak ortaya çıkmaktadır (31). Bu nedenle GUPS, kribriform morfolojinin varlığının hem iğne biyopsilerinde hem de radikal prostatektomi materyallerinde raporda yer alması gerektiği önerisinde bulunmaktadır (27). Kribriform morfoloji sergileyen PKa olgusunun histopatolojik görüntüsü şekil 6'da gösterilmektedir.



Şekil 6. PKa olgusunda kribriform morfolojiye sahip infiltratif tümör izlenmektedir. Bu tümörün Gleason kombine skoru 4+4 olarak hesaplanmıştır (H&E x100).

Gleason skarlama sistemi

Tümör tek bir paternden oluşuyorsa patern rakamı iki ile çarpılarak Gleason skoru verilir. Tümör iki paternden oluşuyorsa önce primer ve sekonder paternlerin hangisi olduğu belirlenmelidir. İki paternden oluşan bir tümörde en sık patern primer patern, ikinci en sık patern ise sekonder paterndir. Gleason skor bu iki paternin toplanmasıyla hesaplanır (Gleason skor= Primer patern + sekonder patern). Şayet tümör tek bir paternden oluşuyor ise o zaman Gleason skor tümördeki grade numarasının iki ile çarpılmasıyla elde edilir (26).

Bazen tümörler üç patern içerebilmektedir. Yani patern 3, patern 4 ve patern 5 aynı vakada bulunabilmektedir. Normalde Gleason skarlaması yapılırken en sık olan patern primer patern, ikinci en sık olan patern sekonder patern olarak yazılıyordu. Ancak her 3 paterni de içeren tümörlerde patern 5 için skarlama sistemi değişmektedir. Bu vakalarda patern 5 en düşük yaygınlıkta olsa bile, patern 5 oranı % 5'in üzerinde ise sekonder patern olarak yazılır (Gleason skor=Primer grade + en yüksek grade). Bu hesaplama hem TRUS biyopsileri hem de radikal prostatektomi materyalleri için bu şekilde uygulanır (27).

Bu bilgi doğrultusunda Gleason skoru hesaplama örnekleri:

Örnek 1: %70 patern 3, %20 patern 4 ve %10 patern 5 içeren biyopside Gleason skoru nasıl hesaplanır?

Gleason skor= 3 (Primer patern) + 5 (En yüksek patern) = 8

Burada patern 5 en az oranda gözükmesine rağmen, patern 5 oranı %5'in üzerinde olduğundan ikinci patern olarak skora dahil edilmiştir.

Örnek 2: %70 patern 4, %20 patern 3 ve %10 patern 5 içeren biyopside Gleason skoru nasıl hesaplanır?

Gleason skor= 4 (Primer patern) + 5 (En yüksek patern) =9

Tersiyer grade ve minör tersiyer grade

Yukardaki örneklerde görüldüğü gibi tümörde eğer 3 patern varsa bunlar yaygınlığına göre sıralanır. En düşük yaygınlıkta bulunan patern tersiyer paterndir. Yukardaki örneklerde patern 5 yaygınlığa göre tersiyer patern olmasına rağmen, yaygınlığı %5'ten fazla olduğundan skarlama sistemine patern 4 yerine ikinci patern olarak yazılmıştır.

Sadece radikal prostatektomi materyallerinde ve gleason skoru 7(3+4 ve 4+3) olan tümörlerde eğer patern 5 varsa ve patern 5 oranı %5'in altındaysa, bu patern için tersiyer patern isimlendirmesi rapora eklenir. Ve ‘‘minör tersiyer patern 5’’ şeklinde ifade edilir (27).

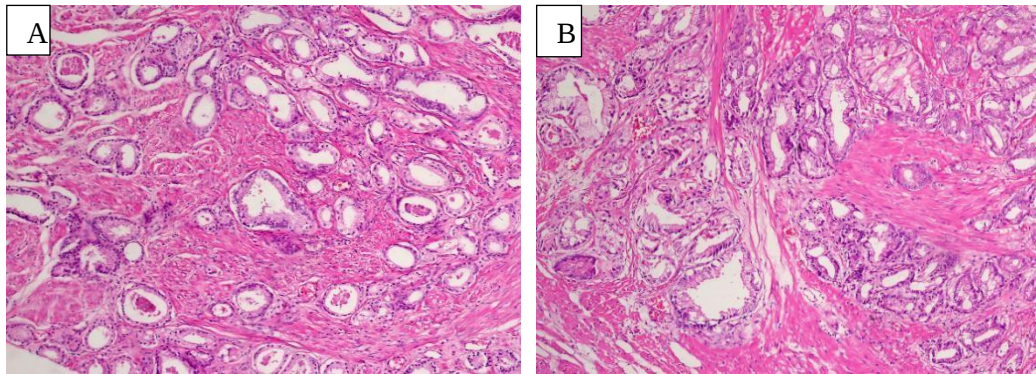
Örnek:

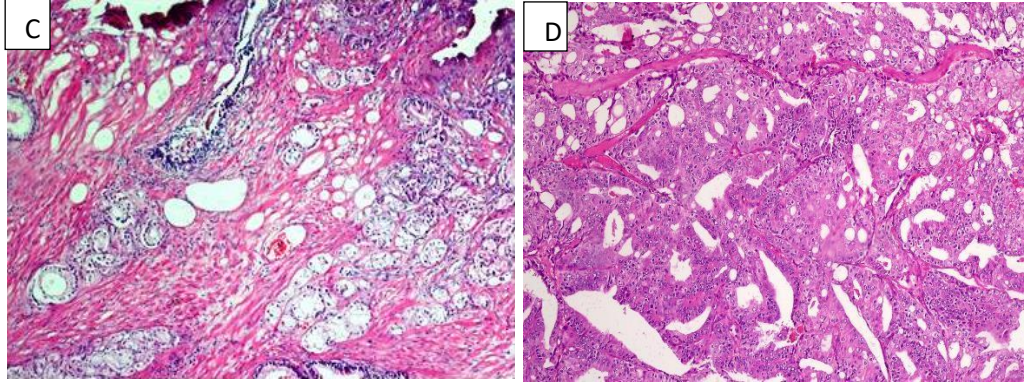
Gleason skor= 4+3= 7 (Grade grup 3), minör tersiyer patern 5 şeklinde tanıya yazılır.

Primer ve sekonder paterni eşit olan tümörlerde örneğin; Gleason skoru 3+3=6 olan tümörlerde %5'in altında patern 4 var ise önceden bu patern tanıya ‘‘tersiyer patern 4’’ şeklinde yazılıyordu. Şu anda bu tümörün Gleason skoru 3+4=7 olarak ifade edilmektedir. Benzer şekilde Gleason skoru 4+4=8 olan tümörlerde % 5'in altında patern 5 var ise bu patern tanıya’’ tersiyer patern 5 ‘‘ olarak yazılıyordu. Ancak şu anda bu tümörün Gleason skoru 4+5=9 olarak ifade edilmektedir. Özetle artık bu olgularda tersiyer patern ifadesi kullanılmamaktadır.

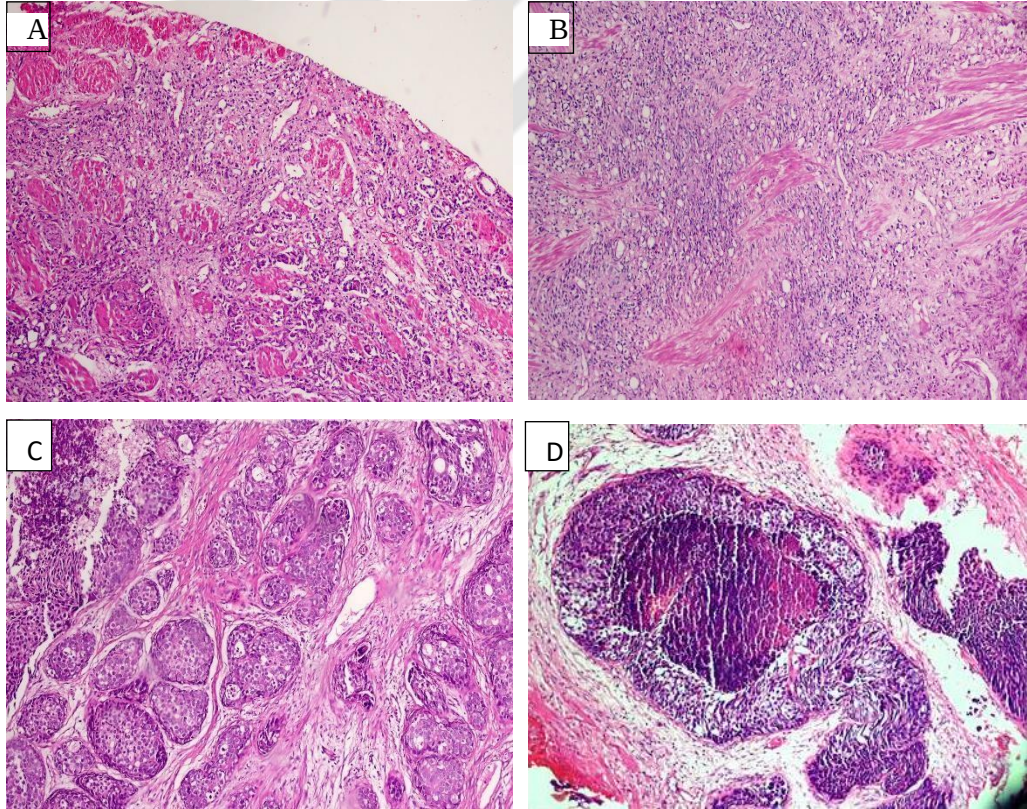
Gleason skor kategorizasyonu

Gleason skorlaması yapıldıktan sonra elde edilen toplam değerler kullanılarak tümörler gruplara ayrılır (Tablo 2). Grade grup şeklinde ifade edilir ve raporlarda belirtilir (27, 28). Farklı Gleason skoruna sahip tümörlerin histopatolojik görüntüleri şekil 7 ve 8’de gösterilmiştir. Bu resimler çalışmamızda yer alan olgulardan alınmıştır.





Şekil 7. Prostatik asiner adenokarsinom. A) İyi seçilebilen glandlardan oluşan Gleason kombine skor 3+3 tümör görülmektedir (H&E x100). B) Fokal bir odakta füzyon yapmış glandlardan oluşan, baskın olarak yine patern 3 glandların izlendiği 3+4 tümör görülmektedir (H&E x100). C) Baskın olarak füzyon yapmış patern 4 glandlarından oluşan, fokal odaklarda patern 3 glandların izlendiği, kombine skoru 4+3 olan tümör görülmektedir (H&E x100). D) Kribriform morfolojiye sahip, 4+4 tümör izlenmektedir (H&E x100).



Şekil 8. Prostatik asiner adenokarsinom. A) Fokal alanda iyi seçilebilen patern 3 glandların görüldüğü, baskın olarak patern 5 olarak sınıflanan tek tek hücreler-hücre kordonlarının izlendiği, Gleason kombine skor 5+3 tümör görülmektedir (H&E x100). B) Fokal odakta patern 5 morfolojisinde, baskın olarak kribriform yapılara sahip patern 4

glanların izlendiği 4+5 tümör görülmektedir (H&E x100). C) Baskın olarak patern 5 morfolojisinde solid adalardan oluşan, fokal olarak patern 4 kribriform yapılarının görüldüğü, kombine skoru 5+4 olan tümör izlenmektedir (H&E x100). D) Merkezinde komedo nekrozu bulunan solid tabakalanma gösteren, kombine skoru 5+5 olan tümör izlenmektedir (H&E x100).

Tablo 2. Gleason skor kategorizasyonu (28)

GLEASON SKOR	GRADE GRUP	DİFERANSİYASYON
≤6	1	İyi diferansiye
3+4	2	Orta-iyi diferansiye
4+3	3	Orta-kötü diferansiye
8*	4	Kötü diferansiye
9, 10	5	İndiferansiye

*Gleason skor 8 içerisinde yer alan paternler 3+5, 5+3 ve 4+4'tür.

Prostat adenokarsinomu tanısında immunohistokimya

PKa tanısında şüphede kalınan olgularda kesin tanı için İHK yöntemler kullanılır. Rutinde en yaygın kullanılan, iki adet İHK boyadan oluşan paneldir. Bunlardan ilki yüksek molekül ağırlıklı sitokeratin olarak isimlendirilen HMWCK boyasıdır. Bu boya normal prostat bezinin miyoepitelyal tabakasında membranöz nitelikte boyanma gösterir. Kanserleşen bezlerde miyoepitelyal tabaka kaybolduğu için boyanmaz. Diğer boya Alfa Metilaçil koa Rasemaz olarak bilinen AMACR'dır. Bu boyanın özgülüğü daha düşük olmasına rağmen, kanserleşen bezlerde sitoplazmik boyanma yapması beklenir.

Şüphede kalınan olgularda immunhistokimyasal olarak AMACR pozitifliği ve HMWCK negatifliği ile tanı kesinleşmiş olur. Bu boyaların dışında başka alternatif boyalar da vardır. PSA ve NKX3.1 tümör hücrelerinde pozitif sonuç vermesi beklenen diğer boyalardır. Miyoepitelyal tabakada boyanma gösteren diğer bir boya olan p63, miyoepitelyal tabakanın varlığı konusunda HMWCK ile kesin bir görüş elde edilemediğinde kullanılabilir. HMWCK ile benzer şekilde, kanserleşen bezlerde miyoepitelyal tabaka olmadığından

boyanmaz. p63 normal prostat bezlerinin miyoepitelyal tabakasında nükleer pozitif boyanma gösterir.

İntraduktal karsinom

Olumsuz prognoz ile ilişkili olduğunu ortaya koyan çalışmalar nedeniyle son dönemde önem kazanan bir lezyondur. Yüksek dereceli PIN'dan daha fazla yapısal ve sitolojik atipiyeye sahip, asinüs içi veya duktus içi epitel proliferasyonu ile karakterizedir. Biyopside tespit edilen bu lezyon büyük oranda, prostat bezinin geri kalanında daha büyük alanda yer alan ve daha yüksek gradeli bir tümöre işaret etmektedir. Bu nedenle klinik olarak olumsuz gidişatın bağımsız bir faktörü olarak görülür (32).

İlerlemiş kanserin habercisi olarak değerlendirilir. Nasıl meydana geldiği ile ilgili farklı görüşler olmakla beraber çoğunlukla kabul edilen mekanizma, infiltratif tümör bezlerinin çevre normal bez-duktus bazal membranlarından geçerek bez-duktus yapılarının iç yüzünde proliferasyonu sonucunda oluşmasıdır (33). Bu lezyonun olumsuz prognozla ilişkili olması nedeniyle raporda mutlaka yer alması gerekir.

Morfolojik olarak miyoepitelyal tabaka ile çevreli geniş tümör adaları vardır. Bu adalarda kribriform nitelikte, bezi yoğun bir şekilde dolduran (lümen alanının en az %50'sini dolduracak şekilde), komedo nekroz içeren veya içermeyen atipik görünümde tümör hücreleri görülür. Lümen alanının %50'sinden azını oluşturan tümör hücreleri varsa bu yapılar gevşek kribriform bezler denir ve intraduktal karsinom tanısı için başka kriterler gereklidir. Bu kriterler komedo nekroz ve normal prostat bezi nükleuslarından 5-6 kat büyük nüvelerin varlığıdır (27).

Tümör hücreleri PKa hücrelerinde olduğu gibi iri hiperkromatik nükleuslu, belirgin nükleoluslu, amfofilik sitoplazmalı hücrelerdir. Yapılan İHK incelemede HMWCK ile sadece tümör adalarının periferinde yer alan miyoepitelyal tabaka boyanır. Tümör hücreleri AMACR ile pozitif sitoplazmik boyanma gösterir.

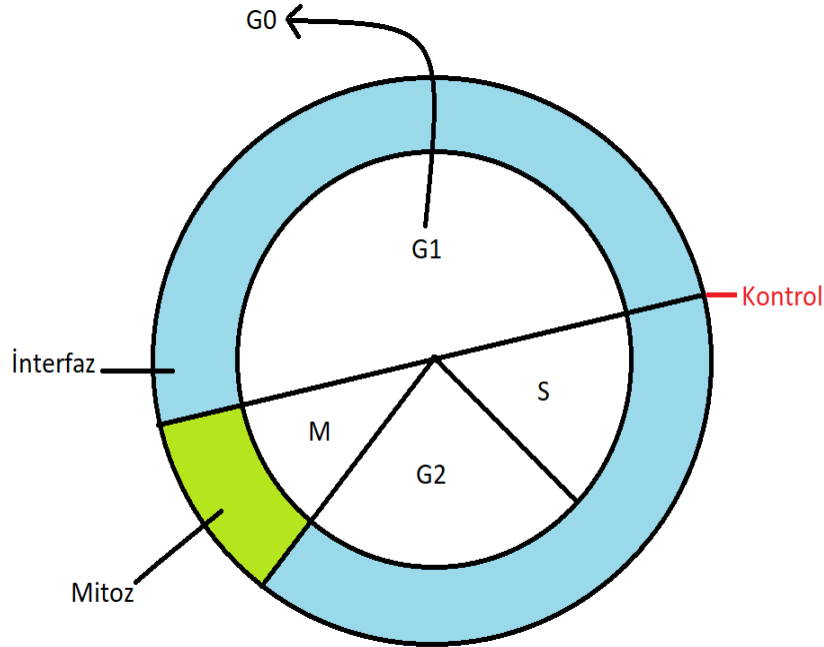
Hücre siklus regülatörleri / Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (p16, p21, p53 ve p57)

Bir hücrenin yaşamına hücre döngüsü adı verilir. Bu döngüde temel olarak iki safha vardır. Hücrelerin büyüdüğü ve hücre bölünmesi için hazırlandığı safha, interfaz safhasıdır.

Diğer safha hücrelerin bölündüğü mitoz (M) safhasıdır. Hücre döngüsünün büyük bir kısmını interfaz safhası oluşturur.

İnterfaz safhası üç bölümden oluşur. Bu bölümler sırasıyla G1, S ve G2'dir (Şekil 9). Hücre yaşamının çoğunun geçtiği bölüm olan G1'de organeller ve proteinler üretilir. Daha sonra hücre Deoksiribonükleik asit (DNA) replikasyonunun gerçekleştiği S fazına geçer. Burada DNA dublikasyonu gerçekleşir ve kromozom sayısı 23'ten 46'ya yükselir. Bazı hücreler S fazına ilerlemez ve G1'de büyüdüktan sonra G0 fazına geçer. Bunlar hücre bölünmesinin gerçekleşmediği sinir vb. dokuların hücreleridir. S fazını tamamlayan hücreler G2 fazına ilerler ve burada hücre büyümesine devam eder. G2 fazında mikrotübül üretimi yapılır. Bu mikrotübül mitoz safhasındaki anafazda kromatidleri ayırmak için kullanılır. Mitoz aşamasında hücre bölünür ve tekrar interfaz safhasına girer (34).

Siklinler hücre döngüsünü düzenleyen önemli protein ailelerinden biridir. Siklinlerin insanlarda dört temel tipi vardır: G1 siklinler, G1 / S siklinler, S siklinler ve M siklinler. Her siklin, hücre döngüsündeki belirli bir faz ile ilişkilidir ve bu fazda gerçekleşen olayları düzenler (35).



Şekil 9. Hücre döngüsü (35)

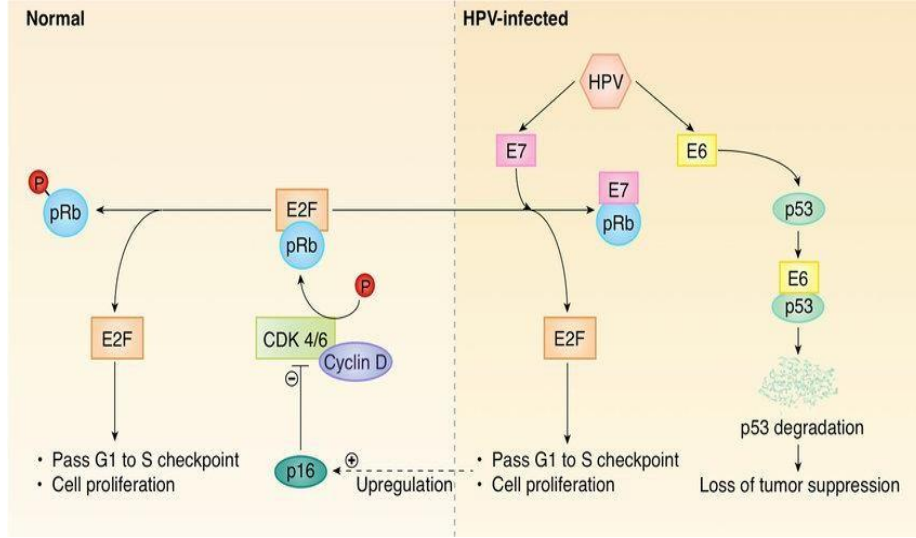
Siklin bağımlı kinazlar (CDK) hücrede sürekli bulunan, hücre döngüsünün ilerlemesinde önemli düzenleyicilerdir. Hücrede normalde inaktif bulunur. Aktif hale geçmeleri için CDK'ya spesifik siklinlerle bağlanmaları gerekir (36). Siklin proteinleri ile bağlanıp aktif hale geçen CDK'lar, ilgili hücre siklus düzenleyici proteine fosfat (P) ekleyerek onu inhibe eder.

E2F, bölünen hücrede G1-S geçişini uyaran transkripsiyon faktörü ailesi üyesidir. Retinoblastom (RB) ise G1-S geçişinde görev yapan tümör supresör proteindir. Bölünmeyen hücrede E2F, RB proteini ile bağlı olduğundan G1-S geçişini uyaramaz. Bölünecek hücrede CDK 4/6-Siklin D kompleksi, RB proteine P ekleyerek onu inaktive hale getirir. Böylelikle E2F serbest kalarak G1-S geçişini uyarır (37).

p16, diğer organ sistemlerinde olduğu gibi prostat bezinde de hücrenin yaşam süresinin düzenlenmesinde önemli role sahiptir. p16 geni CDK inhibitörleri olarak bilinen bir protein grubuna aittir. Bu gen hücresel siklinlere yarışmalı bağlanarak hücre döngüsünün ilerlemesini inhibe etmede önemli rol oynar. p16 tümör supresör bir gen olarak bilinir. Sıklıkla çeşitli kanserlerde inaktive olur ve yaşlanmış hücrelerde yüksek oranda eksprese edilir (38, 39).

Hücre siklus inhibitörlerinden p16, CDK 4/6-Siklin D kompleksinin oluşmasını önleyerek RB proteininin inhibe edilmesini önler (40). RB proteini de hücre siklusunu G1-S geçişi noktasında durdurur. Kanser hücrelerinde kontrolsüz bir şekilde hücre bölünmesi olduğundan p16 proteini daha çok çalışır. Bu durum İHK olarak tümör hücrelerinde p16'nın artmış ekspresyonu olarak açığa çıkabilir.

HPV ile enfekte dokuda ise bu sefer HPV'nin E7 onkojeni doğrudan RB'yi bağlar, açığa çıkan E2F G1-S geçişini uyarır. G1-S geçişinin uyarılması sonucunda meydana gelen hücre proliferasyonu da pozitif feedback yoluyla yine p16 proteininin uyarılmasını sağlar (37). Bu mekanizma HPV ile enfekte dokulardaki İHK olarak artan p16 ekspresyonunu açıklamaktadır. Ayrıca HPV başka bir onkojeni olan E6 ile p53'e doğrudan bağlanır. p53 hücrede en önemli tümör supresör gendir. E6 onkojeni p53'ün fonksiyonunu bozar ve böylece tümör supresyonu azalmış olur (Şekil 10).



Şekil 10. HPV ile enfekte hücrede P16'da görülen ekspresyon artışının mekanizması (37)

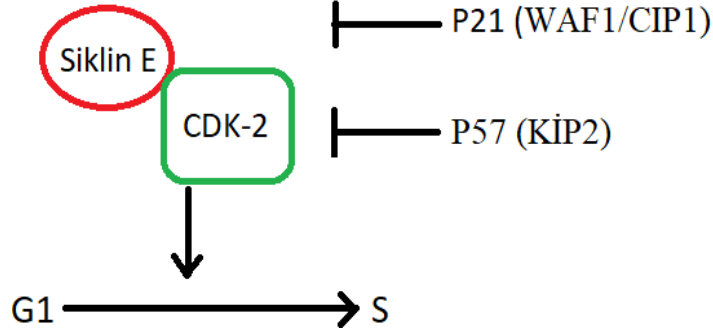
Tümör supresör gen p53, kromozom 17'de lokalizedir. Kanserlerin çoğunda mutasyon için en yaygın hedeftir. Bu protein hücre proliferasyonunun regülasyonunda hayati rol oynar. Yabanıl (wild) tip ve mutant tip olmak üzere iki formu vardır (41).

Son yıllarda, p21 proteini, büyüme kontrolünün p53'e özgü yolunda kritik aşağı akış efektörü olarak tanımlanmıştır. CDK-Siklin komplekslerine bağlanan ve G1 fazında hücre döngüsü durmasına neden olan, CDK inhibitörleri adı verilen hücre döngüsü düzenleyicileri ailesine aittir. p21 proteini, kromozom 6p21.2 üzerinde bulunan bir tümör baskılayıcı gen olan "yabanıl tip p53 ile aktive edilmiş fragman 1" (WAF-1) geni tarafından kodlanır. p21'in transkripsiyonunun yabanıl tip p53 tarafından aktive edildiği ancak mutant p53 tarafından etkinleştirilmediği bulunmuştur (41).

p57, CDK aktivasyonunun inhibisyonu ile hücrelerin G1 fazından progresyonunu regüle eden hücre siklüs inhibitör proteinlerinden biridir (42). Yapılan çalışmalarda malign tümörlerde p57 ile ekspresyon kaybı olduğu bildirilmiştir (42, 43).

G1-S geçişini uyaran diğer bir CDK-Siklin kompleksi CDK2-Siklin E'dir. Siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinden p21 ve p57 proteinleri, bu kompleksin oluşmasını inhibe ederek G1-S geçişini önler (Şekil 11). Böylece hücre proliferasyonu inhibe edilmiş olur.

CDK İNHİBİTÖRLERİ



Şekil 11. p21 ve p57 proteinlerinin hücre siklus regülasyonu mekanizması (41, 42)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Olguların seçimi

Tez için kullanılan olgular Recep Tayyip Erdoğan üniversitesi (RTEÜ) Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi çalışanları için tanımlanan sağlık bilgi yönetim sistemi platformundaki verilerin incelenmesiyle belirlenmiştir. Tümör grubu ve benign grup olmak üzere iki grup tasarlanmıştır. Tümör grubu içinde yer alan her olguda, tümör çevresi benign görünümlü alanlar seçilerek bunlardan diğer bir alt grup oluşturulmuştur. Sonuçta 3 grup oluşturulmuş olup, bu gruplar arasında farklılık olup olmadığı araştırılacaktır. Tezimizde sadece transüretal rezeksiyon (TUR) ile tanı alan olgular kullanılmıştır.

Kanser grubuna hastanemizde 2014-2021 yılları arasında TUR ile prostat kanseri tespit edilen tüm olgular dahil edilmiştir. Bu olgularda patolojik tanı PKa'dır. Toplam 113 adet olgu tespit edilmiştir. Benign grup ise yine hastanemizde 2014-2021 yılları arasında TUR ile nodüler hiperplazi veya BPH tanısı alan olgular içinden rastgele seçilerek oluşturulmuştur. Toplam 121 olgu belirlenmiştir. Tümör grubunda ve benign grupta bazı olgular teknik nedenlerden dolayı çıkarılmıştır. Bu nedenle benign grup için nihai olgu sayısı 112 olarak saptanmıştır.

Kanser grubunda tümör alanı çok küçük olan 2 olgu çıkarıldıktan sonra kanser grubundaki olgu sayısı 111 olup, bu olgularda değerlendirilebilen benign kor sayısı 107'dir. Buradaki 4 adet olgu, dokuların tamamının tümör olması ve benign alan bulunmaması nedeniyle istatistiksel değerlendirmeye alınmamıştır. Sonuçta hem kanser hem de kanser

çevresi benign alan içeren kanser grubundaki olgu sayısı 107'dir. Malign grupta yer alan olguların benign görünümlü alanlarından diğer bir grup elde edilmiş olup, burada da aynı sayıda vaka yer almıştır. Ayrı olarak oluşturulan BPH grubunda yer alan 112 olgu ile beraber çalışmada yer alan toplam vaka sayısı 219 olarak saptanmıştır.

Olguların biyokimyasal ve patolojik verilerinin toplanması

Olguların patoloji raporları sağlık bilgi yönetim sistemi platformundan elde edilmiştir. Raporda yer alan bilgiler olguların yeniden değerlendirilmesi sonrası bir Excel dosyasına kaydedilmiştir. Ayrıca dosyaya tüm olguların işlem öncesi bakılan serum total PSA düzeyleri de eklenmiştir. Burada olgular çeşitli parametreler ile kaydedilmiştir.

Kanser grubu için kullanılan parametreler sırasıyla biyosi no, hasta yaşı, işlem öncesi tıbbi özgeçmiş, makroskopi, işlem öncesi total PSA düzeyi, benign korlar için sırasıyla p16, p21, p53 ve p57 İHK boyanma sonuçları, tümör korları için sırasıyla p16, p21, p53 ve p57 İHK boyanma sonuçları, tanı, Gleason patern, kombine skor, grade grup, tümör yüzdesi, perinöral invazyon, nekroz ve anjiolenfatik invazyon olarak belirlenmiştir.

Benign grup için kullanılan parametreler sırasıyla biyosi no, hasta yaşı, işlem öncesi tıbbi özgeçmiş, makroskopi, işlem öncesi total PSA düzeyi, sırasıyla p16, p21, p53 ve p57 İHK boyanma sonuçları, tanı ve eşlik eden bulgular olarak belirlenmiştir.

Histopatolojik değerlendirme ve parafin blok seçimi

Belirlenen olguların lamaları RTEÜ Tıp fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yer alan lam arşivinden çıkarılmıştır. Kanser grubu için çıkarılan lamalar yeniden değerlendirilerek lam üzerinde yer alan PKa'yı temsil eden bir alan ve PKa etrafı benign glandlardan oluşan diğer bir alan seçilmiştir. Bu seçilen alanlar lam kalemi ile çember içine alınmıştır. BPH grubu için çıkarılan lamlarda nodüler hiperplaziye temsil eden rastgele bir alan yine lam kalemi ile çember içine alınmıştır. Kanser grubunda bazı olguların tamamı tümörden oluştuğundan bu olgular iptal edilmiştir. Belirlenen lamaların parafin blokları patoloji laboratuvarı blok arşivinden çıkarılmıştır.

Doku mikrodizileri (Tissue microarray) yöntemi

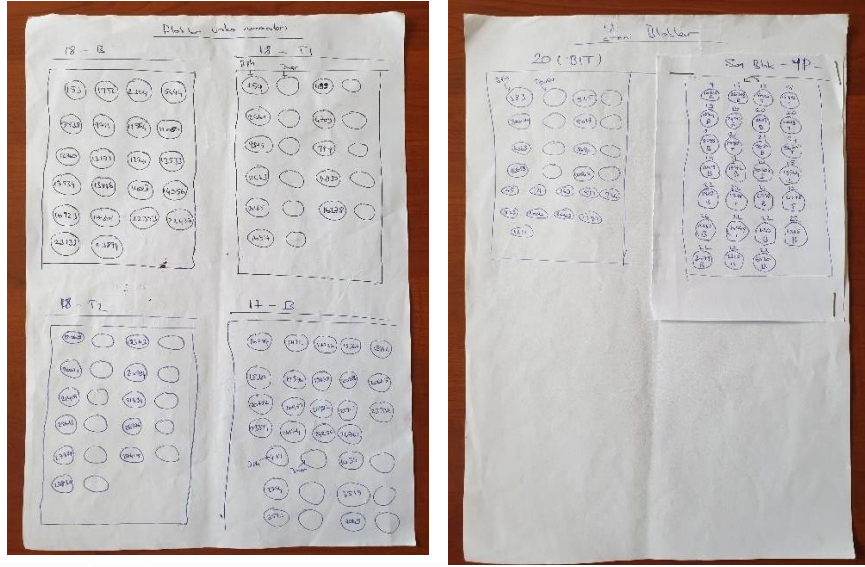
Tissue microarray (TMA) yöntemi, patoloji pratiğinde yapılan çalışmalarda kullanılan, çalışmaya özel bir çeşit parafin blok hazırlama yöntemidir (44). Bu yöntem özellikle İHK kullanılacak çalışmalarda daha az kit harcanmasını sağlaması ve olguların değerlendirilmesi konusunda sağladığı kolaylık nedeniyle tercih edilebilmektedir.

TMA yöntemiyle parafin blokların hazırlanması

TMA için silikon ham maddeden mamul hazır kalıplar ve bloklardan kor çıkarmak üzerine geliştirilmiş aletler bulunmaktadır. Ancak bu ürünler çok pahalı olduğundan burada kendi rutinimizde kullandığımız yöntemden bahsedilecektir. Biz bu yöntem için deri ve zührevi hastalıklar bölümünde kullanılan deri punch biyopsi aletlerinden faydalandık.

Öncelikle TMA işleminde kullanılmak üzere yeni parafin blok dökümü yapılır. Sıvı parafin kalıplara dökülür ve üzerine kaset yerleştirildikten sonra dondurulur. Parafin iyice donup katılaştıktan sonra kalıplardan çıkarılır. Donmuş parafine hemen işlem yapılmaz, çünkü çatlama ve bozulmaya daha elverişlidir. Birkaç gün oda sıcaklığında bekletilerek biraz yumuşaması sağlanır. Daha sonra önceden temin edilen deri punch biyopsi aleti ile parafin bloktan bir adet kor çıkarılır. Böylece ekilecek doku için uygun yuva oluşur. Oluşan yuvanın boyutu kullanılan punch biyopsi aletinin kor boyutuna göre değişir. Punch biyopsi aleti içine alınan dokunun çıkarılması için daha önceden belirlenen ince ve uzun olan herhangi bir cisim kullanılabilir. Örneğin açılmış ve düz hale getirilmiş bir ataç bu işlem için uygun olabilir. Bu cisim, kullanılan punch biyopsi aletinin aldığı korun genişliğine uygun olmalıdır. Daha sonra bu cisim punch biyopsi aletinin arka kısmından sokularak ön tarafa doğru yavaşça ilerletilir. Cisim, biyopsi aleti içerisindeki parafin koruna temas ettiğinde hafifçe bastırılarak korun çıkması sağlanır. Böylelikle punch aleti sonraki işlem için hazır hale gelmiş olur.

Lamlardan işaretlenen yer, ilgili parafin blok ile eşleştirildikten sonra punch biyopsi aleti vasıtasıyla çıkarılır. Alınan kor, daha önce boş parafin bloktan açılan yuvaya ekilir. Her seferinde tek bir yuva açılır ve bu yuva yeni kor ile doldurulur. Bu işleme parafin blok üzerinde uygun yer bitinceye kadar devam edilir. Olguların yeni blokta temsil edildiği korlar, yerinin karıştırılmaması adına haritalandırılarak kaydedilir (Şekil 12). Yeni oluşan parafin blokta, ekilen doku korları ile korların yuvaları arasında oluşan boşlukları ortadan kaldırmak ve dokunun yuvasına daha iyi sarılmasını sağlamak için blok etüve alınır. Korların yuvalarından düşmesini önlemek için blok üzerine bir lam konulur. Bu şekilde etüve giren yeni blok etüvde yaklaşık 45 derecede ortalama 2 saat bekledikten sonra çıkarılır. Tekrar soğuk yüzeye temas ettirildikten sonra kesit işlemine hazır hale gelir.



Şekil 12. Olguların yeni blokta temsil edildiği korların haritalandırılarak kaydedilmesi

Bu çalışmada farklı olarak yeni blok hazırlanırken son aşamada yapılan etüve alma işlemi kullanılmadı. Çünkü bloklar daha farklı bir teknikle hazırlandı. Bu çalışmada 2mm'lik ve 3mm'lik kor genişliğine sahip 2 punch biyopsi aleti kullanıldı. Küçük olan 2mm'lik punch biyopsi aletiyle parafin blok üzerinde açılan yuva, 3mm'lik aletle alınmış dokularla dolduruldu. Daha küçük yuvaya 3mm kalınlığındaki dokular sıkıştırılarak ekildiği için doku ile yuvası arasında boşluk kalmadı. Böylece etüve almadan bloklar hazır hale geldi.

TMA ile aynı bloğa çok sayıda farklı olgu eklenir. Bu bloktan 4 mikron kalınlığında kesitler lam üzerine alınır. Elde edilen lamalar daha sonra boyanmak üzere İHK veya histokimya (HK) cihazlarına verilir. Boyanma işlemi bittikten sonra lamalar lamel ile kapatılır ve değerlendirme için hazır olur. Lam üzerindeki vakalara ait kor şeklinde olan kesitlerin değerlendirilmesi daha önce yapılan haritalandırma üzerinden yapılır.

TMA kullanılmadan yapılan çalışmalarda tek bir lama en fazla 2-3 adet farklı olguya ait kesit alınabilirken, bu yöntem ile 30 adet farklı vakaya ait kesit alınabilmektedir. Kullanılan punch biyopsi aletinin aldığı korun çapına göre bu sayı daha da artabilmektedir. Dolayısıyla İHK çalışma için tek bir kit kullanılarak 30 vakanın boyanma profili tek lam üzerinde değerlendirilebilir. TMA yöntemi ile harcanan zamandan, iş yükünden ve çalışma maliyetinden tasarruf edilmiş olur.

İmmunohistokimyasal Boyanma Yöntemi

Çalışmamızda TMA yöntemi kullanılarak toplam 15 blok hazırlandı. Kanser grubunda her bir olgudan kanser alanını temsilen bir kor ve kanser etrafı benign veya BPH alanını temsilen bir kor olmak üzere toplam iki kor alındı. Benign gruptan ise her bir olgu için BPH alanını temsil eden tek bir kor alındı. Elde edilen korlar tek blokta maksimum 30 tane olacak şekilde bloklara ekildi. Kanser grubunda yer alan olguların malign alanlarından 107 kor, benign alanlarından da aynı şekilde 107 kor alınmıştır. Teknik nedenlerden dolayı çıkarılan vakalar hariç tutulduğunda, kanser grubundan 214 kor ve benign gruptan ise 112 kor olmak üzere toplam 326 adet kor ekimi yapılarak 15 blok oluşturuldu (Şekil 13).



Şekil 13. TMA yöntemiyle hazırlanan 15 blok ve bu bloklardan elde edilen H&E boyalı lamalar izlenmektedir.

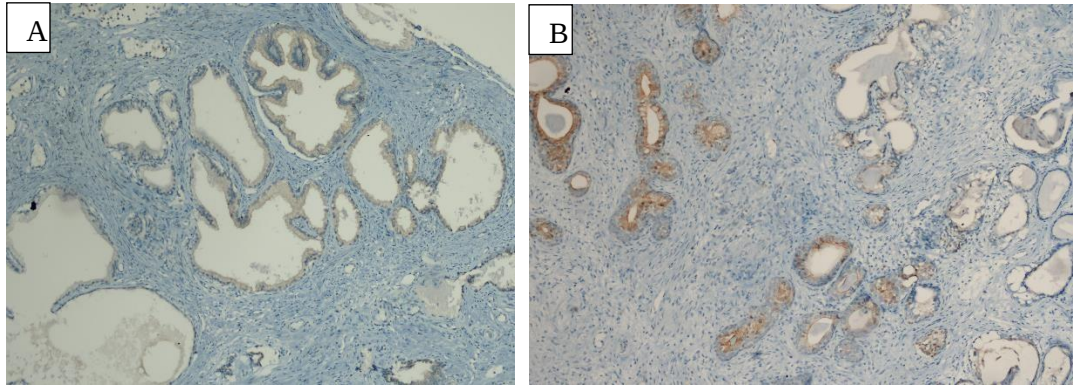
Oluşan bloklardan İHK için elde edilen kesitlerin her birine p16 (anti-p16INK4a-E6H4 klonu, yaklaşık 1 mikrogram/ml), p21 WAF1/CIP1 (DCS-60.2 klonu), p53 (Bp53-11 klonu, yaklaşık 2.5 mikrogram/ml) ve p57/Kip2 (Kp 10 klonu) İHK boyalarından oluşan panel uygulanmıştır. İHK boyama işlemi VENTANA BenchMark ULTRA cihazında yapılmıştır. İHK boyalı toplam 60 lam elde edilmiştir (Şekil 14). Daha önceden haritalandırılan olguların yerleri eşleştirildikten sonra boyanma sonuçları değerlendirilmiş olup, bulgular Excel dosyasına kaydedilmiştir.



Şekil 14. TMA yöntemiyle hazırlanan 15 bloktan elde edilen toplam 60 adet İHK boyalı lam izlenmektedir.

İmmunohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesi

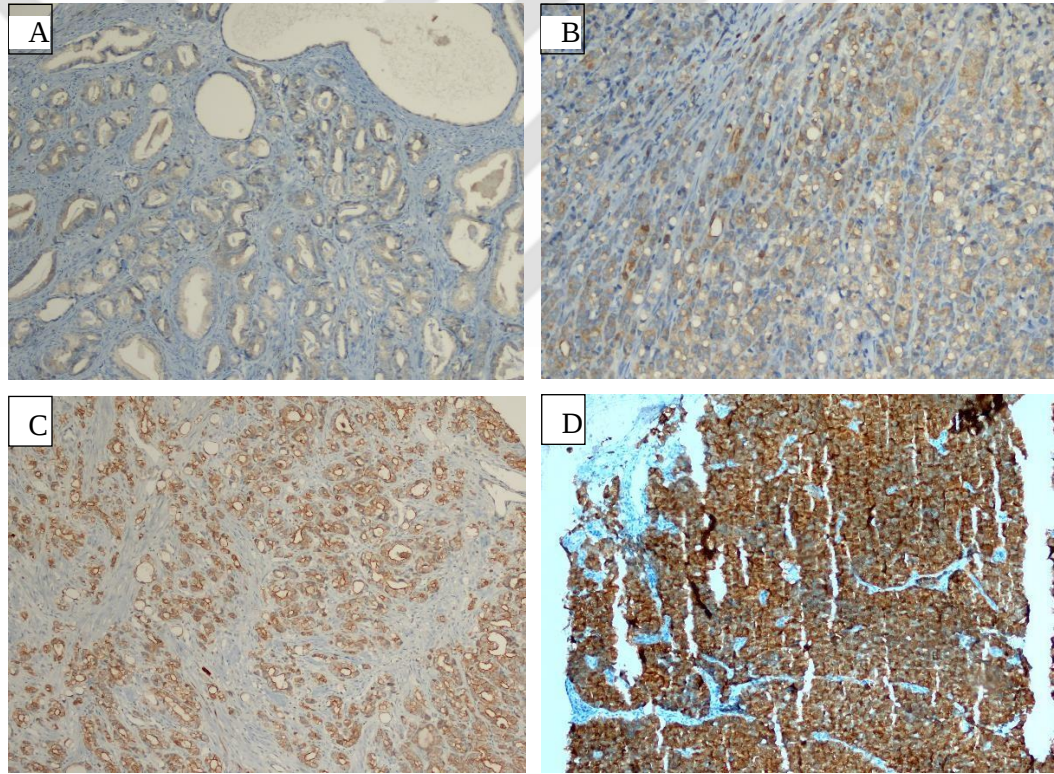
Olgulardaki boyanma profilini değerlendirmeden önce boyanma yoğunluğuna göre kategoriler oluşturulmuştur. Buna göre p16 için sadece sitoplazmik veya nükleer boyanma kabul edilmiş olup, zayıf membranöz nitelikteki boyanmalar değerlendirilmeye alınmamıştır. Negatif boyanma, zayıf, orta ve kuvvetli pozitif boyanma olmak üzere 4 kategori oluşturulmuştur. Buna göre malign veya benign olgulardaki hücrelerin %0-1 kadarında görülen boyanma negatif boyanma, %2-20'si kadarında olan boyanmalar zayıf pozitif boyanma, %21-50 kadarında olan boyanmalar orta pozitif boyanma, %51 ve daha fazlası kadarında olan boyanmalar ise kuvvetli pozitif boyanma olarak değerlendirilmiştir (Şekil 15 ve 16).



Şekil 15. Nodüler hiperplazi veya BPH olgularında İHK olarak p16 ile boyanma durumu görülmektedir (İHK x100). A) p16 ile negatif boyanma izlenmektedir. B) p16 ile zayıf pozitif boyanma görülmektedir.

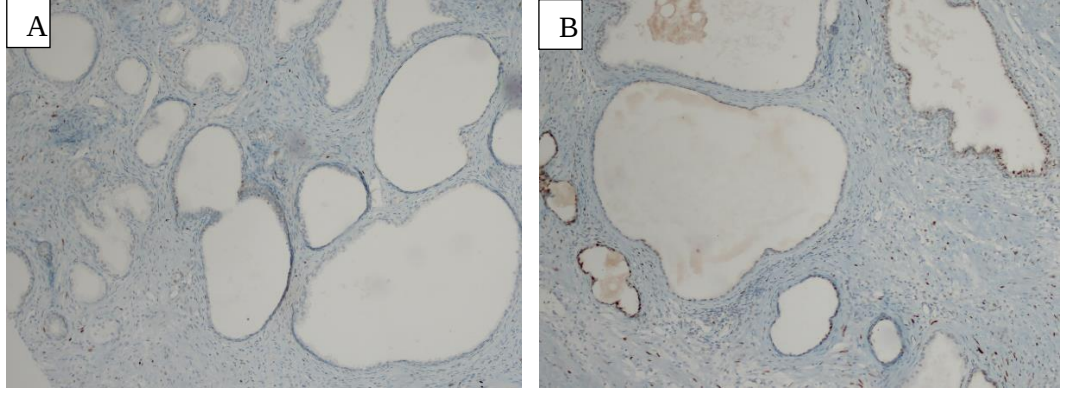
p21 için nükleer boyanma kabul edilmiş olup, p16'da olduğu gibi 4 kategori oluşturuldu. Buna göre malign veya benign olgulardaki hücrelerin %0-1 kadarında görülen boyanma negatif boyanma, %2-20'si kadarında olan boyanmalar zayıf pozitif boyanma, %21-40 kadarında olan boyanmalar orta pozitif boyanma, %41 ve daha fazlası kadarında olan boyanmalar ise kuvvetli pozitif boyanma olarak değerlendirilmiştir (Şekil 17 ve 18). Stromal hücrelerde görülen boyanmalar değerlendirme dışı tutulmuştur.

p53 için nükleer boyanmalar değerlendirilmeye alınmıştır. 3 kategori oluşturulmuştur. Buna göre tümör hücrelerinde hiçbir boyanma yoksa bu boyanma mutasyonel negatif boyanma olarak kabul edilmiştir. Tümör hücrelerinin büyük kısmında kuvvetli nükleer pozitif boyanma mutasyonel pozitif boyanma olarak kabul edilmiştir.

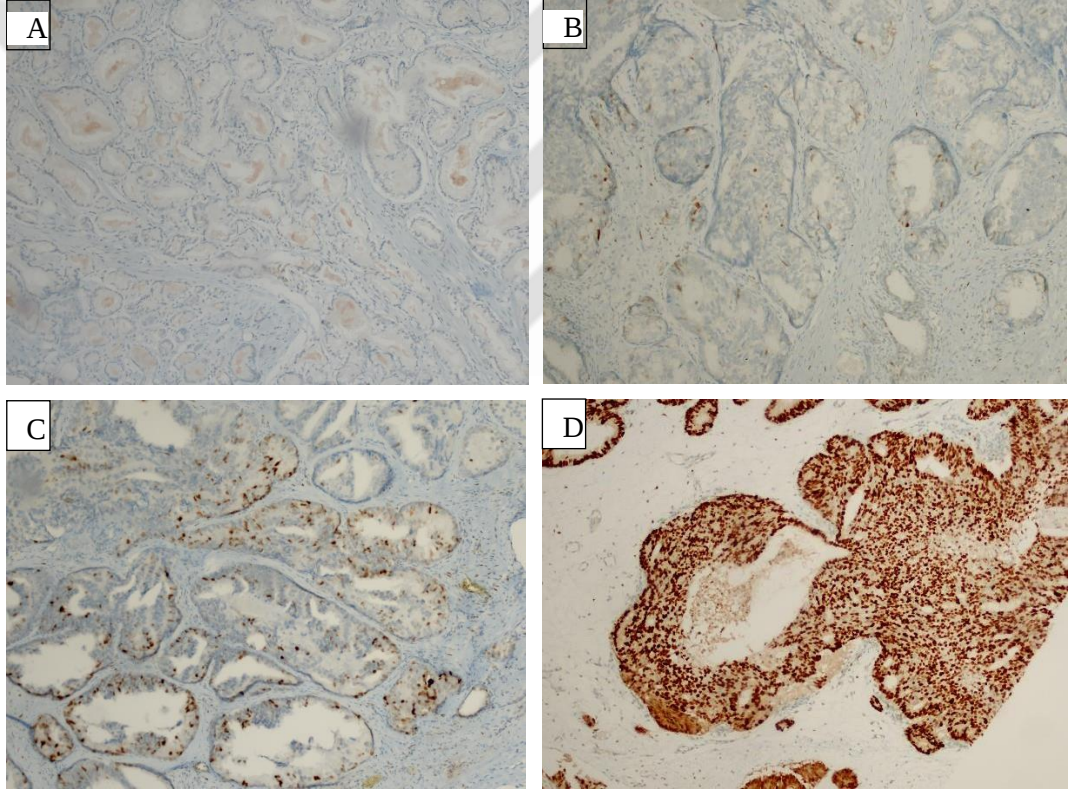


Şekil 16. PKa olgularında İHK olarak p16 ile boyanma durumu görülmektedir (İHK x100). Resim A, B, C ve D'de p16 ile sırasıyla negatif, zayıf pozitif, orta pozitif ve kuvvetli pozitif boyanma izlenmektedir.

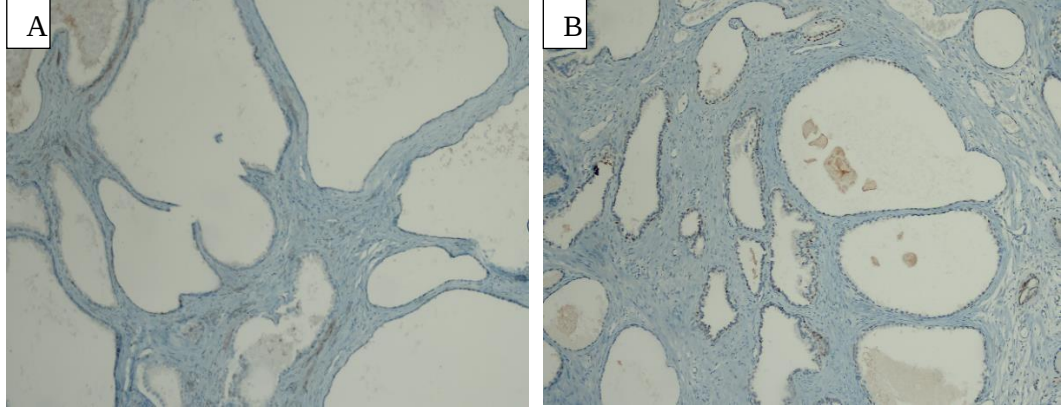
Tümör hücrelerinin bir kısmında çeşitli yoğunluklarda nükleer pozitif boyanmalar wild tip boyanma olarak kabul edilmiştir (Şekil 19 ve 20). Diğer bir mutasyonel p53 boyanma şekli olan sitoplazmik pozitif boyanma bizim serimizde izlenmediğinden değerlendirilmeye alınmamıştır.



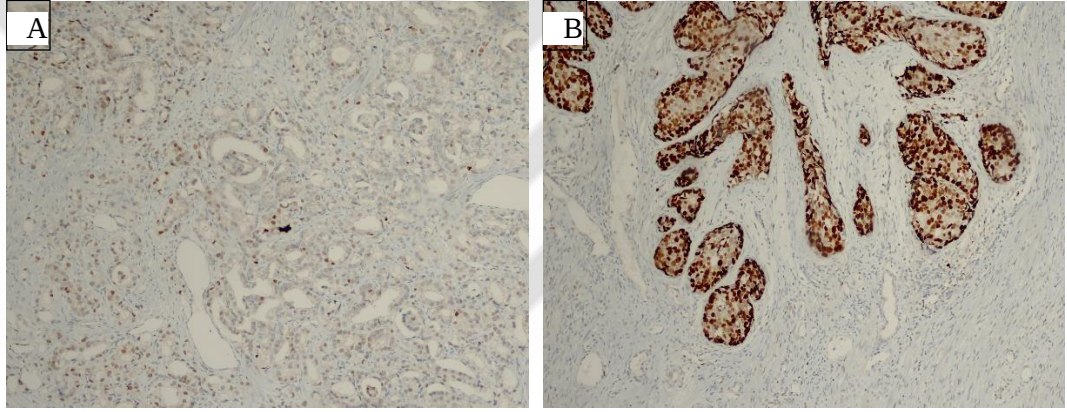
Şekil 17. Nodüler hiperplazi veya BPH olgularında İHK olarak p21 ile boyanma durumu görülmektedir (İHK x100). A) p21 ile negatif boyanma izlenmektedir. B) p21 ile zayıf pozitif boyanma görülmektedir.



Şekil 18. PKa olgularında İHK olarak p21 ile boyanma durumu görülmektedir (İHK x100). Resim A, B, C ve D’de p21 ile sırasıyla negatif, zayıf pozitif, orta pozitif ve kuvvetli pozitif boyanma izlenmektedir.

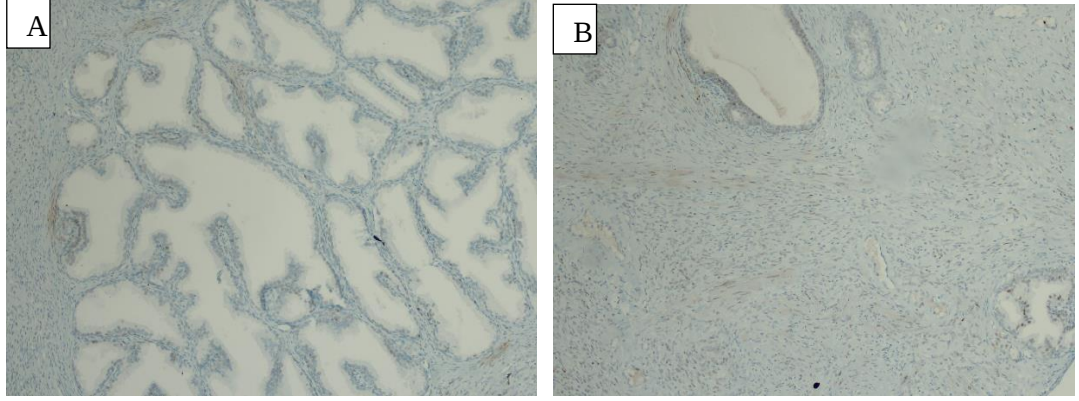


Şekil 19. Nodüler hiperplazi veya BPH olgularında İHK olarak p53 ile boyanma durumu görülmektedir (İHK x100). A) p53 ile negatif boyanma izlenmektedir. B) p53 ile wild tip boyanma görülmektedir.

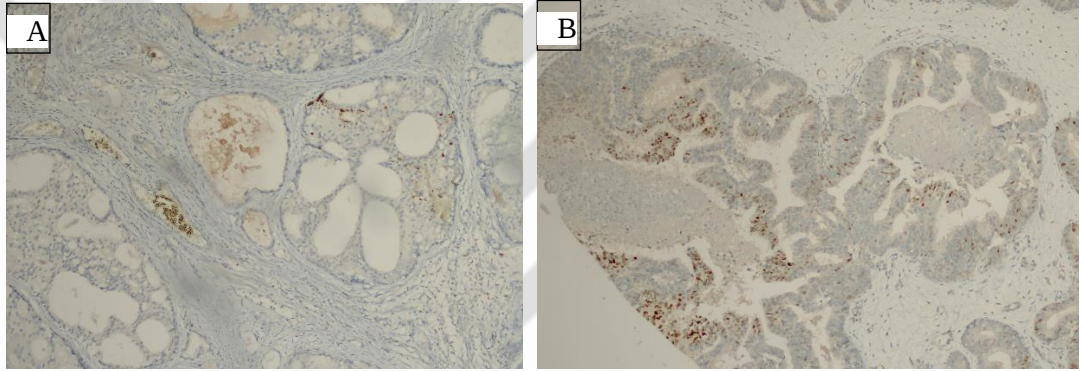


Şekil 20. PKa olgularında İHK olarak p53 ile boyanma durumu görülmektedir (İHK x100). A) p53 ile wild tip boyanma izlenmektedir. B) p53 ile mutant pozitif boyanma görülmektedir.

p57 için nükleer boyanma değerlendirilmeye alınmıştır. Ancak bizim serimizde p57 ile boyanma yoğunluğu oldukça düşük olduğundan kuvvetli pozitif kategorisi çıkarılmıştır. Negatif boyanma, zayıf pozitif boyanma ve orta pozitif boyanma olmak üzere 3 kategori oluşturulmuştur. Buna göre tümör hücrelerinde hiçbir boyanma yoksa negatif boyanma, tümör hücrelerinin %1-10'u kadarında görülen boyanma zayıf pozitif boyanma ve %10'dan fazlasında görülen boyanma orta pozitif boyanma olarak değerlendirilmiştir (Şekil 21 ve 22).



Şekil 21. Nodüler hiperplazi veya BPH olgularında İHK olarak p57 ile boyanma durumu görülmektedir (İHK x100). A) p57 ile negatif boyanma izlenmektedir. B) p57 ile zayıf pozitif boyanma görülmektedir.



Şekil 22. PKa olgularında İHK olarak p57 ile boyanma durumu görülmektedir (İHK x100). A) p57 ile zayıf pozitif boyanma izlenmektedir. B) p57 orta pozitif boyanma görülmektedir.

Verilerin istatistiksel analizi

Elde edilen bulgular Excel dosyasına kaydedildikten sonra kanser grubunu oluşturan olgular 1 rakamı ile numaralandırılmış olup “Grup BT” kategorisine alınmıştır. BPH veya benign grupta yer alan olgular ise 2 rakamı ile numaralandırıldıktan sonra “Grup B” kategorisine alınmıştır. Daha sonra veriler istatistik programına aktarılmıştır. Analizlerde kanser alanları, kanser alanları etrafında yer alan non-neoplastik alanlar ve BPH grubu verileri İHK boyanma özellikleri kullanılarak tümöröenez açısından karşılaştırılacaktır.

Veriler IBM SPSS Statistics for Windows. Armonk, NY, USA, IBM Corp. yazılımı ile analiz edilmiştir. Araştırmada elde edilen sayısal veriler, ortalama ve standart sapma değerleri ile, kategorik veriler ise sayı ve yüzde değerleri ile gösterilmiştir. Kategorik veriler arasındaki ilişkiler Pearson ki-kare testi ve Fisher's Exact Test ile değerlendirilmiştir. Tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Grup BT (Grup 1)'de 107 olgu yer almakta olup, tüm vakaların % 48,8'ini oluşturmaktadır. Grup B'de ise 112 olgu yer almakta olup, tüm vakaların % 51,2'sini oluşturmaktadır. Grup BT olgularında ortalama yaş 75,4 olup, grup B olgularında ise 68.9 olarak saptanmıştır. Grup BT olgularında ortalama serum total PSA değeri 58.9 olup, grup B olgularında ise 5.2 olarak saptanmıştır (Tablo 3).

Tablo 3. Grup BT ile grup B'de yer alan olgulardaki yaş ve total PSA durumu

GRUP	ORTALAMA YAŞ	STANDART SAPMA	ORTALAMA TOTAL PSA	STANDART SAPMA
GRUP BT (n=107)	75.4	8.898	58.9	179.572
GRUP B (n=112)	68.9	8.486	5.2	4.164

Grup BT'de yer alan malign olguların prognostik öneme sahip bazı verileri incelenmiştir. Buna göre en sık görülen paternler 45 olguda (%42) patern 3, 47 olguda (%44) patern 4 ve 15 olguda (%14) patern 5 olarak saptanmıştır. Buna göre patern 4, tüm malign olgular içerisinde en çok görülen patern olmuştur. En az görülen patern ise 5'tir. Olgular kombine skor değerlerine göre sınıflandırılmış olup, 29 olgu (%27) 3+3, 16 olgu (%15) 3+4, 13 olgu (%12) 4+3, 15 olgu (%14) 4+4, 1 olgu (%1) 5+3, 19 olgu (%18) 4+5, 9 olgu (%8) 5+4 ve 5 olgu (%5) 5+5 olarak belirlenmiştir. Kombine skorlara göre grade gruplar belirlenmiş olup, 29 vaka (%27) grup 1, 16 vaka (%15) grup 2, 13 vaka (%12) grup 3, 16 vaka (%15) grup 4 ve 33 vaka (%31) grup 5 olarak sınıflanmıştır. Gruplar arasında olgu sayısı en yüksek olan grup 5'tir. Olgu sayısı en yüksek ikinci grup ise grup 1'dir. Olgu sayısı en az olan grup ise grup 3 olarak saptanmıştır. Olguların 27 tanesinde (%25) perinöral invazyon mevcut olup, 2 tanesinde (%2) nekroz ve 6 tanesinde (%6) lenfatik invazyon izlenmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Grup BT’de yer alan malign olgulardaki bazı prognostik değişkenlerin dağılımı

GRUP BT İÇİN DEĞİŞKENLER		SAYI	YÜZDE
GLEASON PATTERN	3	45	42
	4	47	44
	5	15	14
	3+3	29	27
	3+4	16	15
KOMBİNE SKOR	4+3	13	12
	4+4	15	14
	5+3	1	1
	4+5	19	18
	5+4	9	8
	5+5	5	5
	1	29	27
GRADE GRUP	2	16	15
	3	13	12
	4	16	15
	5	33	31
	5	33	31
PERİNÖRAL İNVAZYON	Görölmedi	80	75
	Mevcut	27	25
NEKROZ	Görölmedi	105	98
	Mevcut	2	2
LENFATİK İNVAZYON	Görölmedi	101	94
	Mevcut	6	6

Grup BT’de yer alan benign korların İHK boyanma durumu değerlendirildiğinde, 7 olgu (%7) p16 ile zayıf pozitif boyanma göstermiş olup, geri kalan 100 olgu (%93) negatiftir. p21 İHK boyasında ise 69 olgu (%64) zayıf pozitif, 1 olgu (%1) orta pozitif sonuç vermiş olup, geri kalan 37 olgu (%35) negatiftir. P53 ile 105 olgu (%98) wild tipte boyanma göstermiştir. İki olgu (%2) p53 negatif olup, olguların hiçbirinde mutant pozitif boyanma saptanmamıştır. p57 ile 4 olgu (%4) zayıf pozitif boyanma göstermiş olup, 103 olguda (%96) boyanma görölmemiştir.

Grup BT’de yer alan malign korların İHK boyanma durumu değerlendirildiğinde, p16 ile 33 olgu (%31) zayıf pozitif, 14 olgu (%13) orta pozitif sonuç vermiş olup, 60 olguda (%56) boyanma saptanmamıştır. p21 ile 47 olgu (%44) zayıf pozitif, 33 olgu orta pozitif (%33) ve 3 olgu (%3) kuvvetli pozitif sonuç vermiş olup, 24 olguda (%22) boyanma izlenmemiştir. p53 ile 65 olguda (%61) wild tipte boyanma izlenmiş olup, 13 olguda (%12) mutant pozitif boyanma saptanmıştır. Geri kalan 29 (%27) olguda ise p53 ile boyanma

izlenmemiştir. p57 ile 7 olguda (%7) zayıf pozitif boyanma ve 1 olguda (%1) orta pozitif boyanma izlenmiş olup, geri kalan 99 olguda (%92) ise boyanma saptanmamıştır. Pearson ki-kare istatistiksel yöntemi ile grup BT'deki benign korlar ve malign korlar arasında p16, p21 ve p53 İHK boyanması yönünden anlamlı bir ilişki mevcuttur ($p<0.001$). p57 boyanması yönünden anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p=0.386$). Bulgular tablo 5'te gösterilmektedir.

Tablo 5. Uygulanan İHK panelde grup BT içerisinde yer alan benign ve malign korlar arasındaki boyanma durumlarının karşılaştırılması

İHK	BOYANMA SKORLAMASI	GRUP BT-BENİGN OLGU SAYISI (%)	GRUP BT-MALİGN OLGU SAYISI (%)	P DEĞERİ
p16	Negatif	100 (93)	60 (56)	<0.001*
	Zayıf pozitif	7 (7)	33 (31)	
	Orta pozitif	0	14 (13)	
p21	Negatif	37 (35)	24 (22)	<0.001*
	Zayıf pozitif	69 (64)	47 (44)	
	Orta pozitif	1 (1)	33 (31)	
p53	Kuvvetli pozitif	0	3 (3)	<0.001*
	Negatif	2 (2)	29 (27)	
	Wild tip boyanma	105 (98)	65 (61)	
p57	Mutant pozitif	0	13 (12)	0.386*
	Negatif	103 (96)	99 (92)	
	Zayıf pozitif	4 (4)	7 (7)	
	Orta pozitif	0	1 (1)	

*Pearson ki-kare testi

Grup B'de yer alan olguların İHK boyanma durumu değerlendirildiğinde, 30 olgu (%27) p16 ile zayıf pozitif boyanma göstermiş olup, geri kalan 82 olgu (%73) negatiftir. p21 İHK boyasında ise 66 olgu (%59) zayıf pozitif, 1 olgu (%1) orta pozitif sonuç vermiş olup, geri kalan 45 olgu (%40) negatiftir. p53 ile 101 olgu (%90) wild tipte boyanma göstermiştir. On bir olgu (%10) p53 negatif olup, olguların hiçbirinde mutant pozitif boyanma saptanmamıştır. p57 ile 5 olgu (%4) zayıf pozitif boyanma göstermiş olup 107 olguda (%96) boyanma görülmemiştir. Pearson ki-kare istatistiksel yöntemi ile grup BT'deki malign korlar ve grup B'de yer alan benign olgular arasında p16, p21 ve p53 İHK boyanması yönünden anlamlı bir ilişki mevcuttur ($p<0.001$). p57 boyanması yönünden anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p=0.386$). Bulgular tablo 6'da gösterilmektedir.

Tablo 6. Uygulanan İHK panelde grup BT içerisinde yer alan malign korlar ile grup B içerisinde yer alan benign olgular arasındaki boyanma durumlarının karşılaştırılması

İHK	BOYANMA SKORLAMASI	GRUP BT-MALİGN OLGU SAYISI (%)	GRUP B OLGU SAYISI (%)	P DEĞERİ
p16	Negatif	60 (56)	82 (73)	<0.001*
	Zayıf pozitif	33 (31)	30 (27)	
	Orta pozitif	14 (13)	0	
p21	Negatif	24 (22)	45 (40)	<0.001*
	Zayıf pozitif	47 (44)	66 (59)	
	Orta pozitif	33 (31)	1 (1)	
p53	Kuvvetli pozitif	3 (3)	0	<0.001*
	Negatif	29 (27)	11 (10)	
	Wild tip boyanma	65 (61)	101 (90)	
p57	Mutant pozitif	13 (12)	0	0.386*
	Negatif	99 (92)	107 (96)	
	Zayıf pozitif	7 (7)	5 (4)	
	Orta pozitif	1 (1)	0	

*Pearson ki-kare testi

Pearson ki-kare istatistiksel yöntemi ile grup BT'deki benign korlar ve grup B'de yer alan benign olgular arasında p16 ve p53 İHK boyanması yönünden anlamlı bir ilişki mevcuttur ($p<0.001$, $p=0.017$). p21 ve p57 boyanması yönünden anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p=0.765$, $p=1$). Bulgular tablo 7'de gösterilmektedir.

Tablo 7. Uygulanan İHK panelde grup BT içerisinde yer alan benign korlar ile grup B içerisinde yer alan benign olgular arasındaki boyanma durumlarının karşılaştırılması

İHK	BOYANMA SKORLAMASI	GRUP BT-BENİGN OLGU SAYISI (%)	GRUP B OLGU SAYISI (%)	P DEĞERİ
p16	Negatif	100 (93)	82 (73)	<0.001*
	Zayıf pozitif	7 (7)	30 (27)	
p21	Negatif	37 (35)	45 (40)	0.765*
	Zayıf pozitif	69 (64)	66 (59)	
p53	Orta pozitif	1 (1)	1 (1)	0.017*
	Negatif	2 (2)	11 (10)	
p57	Wild tip boyanma	105 (98)	101 (90)	1*
	Negatif	103 (96)	107 (96)	
	Zayıf pozitif	4 (4)	5 (4)	

*Pearson ki-kare testi

Grade gruplar arasında İHK boyanma durumu incelenmiştir. Burada tablo oluşturulurken istatistiksel analizin anlamlı çıkması için pozitif ve negatif boyanma olmak üzere 2 başlık kullanılmıştır. Buna göre boyanma skoruna bakılmaksızın tüm pozitif boyanmalar pozitif başlığı altında toplanmıştır. Negatif boyanmalar da negatif boyanma başlığı altında yer almıştır. Burada farklı olarak p53 İHK boyamasındaki olgulardan wild tipte boyanma gösterenler pozitif başlığı altına alınmış olup, negatif ve mutant pozitif

boyanma gösterenler yani mutasyonel boyanma yapanlar ise negatif başlığı altına alınmıştır. p53, normal hücrede wild tipte boyanma yapar. Yani wild tipte boyanma p53'ün normal çalıştığının göstergesidir. p53, normal olmayan hücrede ise 3 tipte boyanma yapar. Bunlar negatif boyanma, mutant pozitif boyanma ve sitoplazmik pozitif boyanmadır. Negatif boyanma ve mutant pozitif boyanma burada belirtildiği üzere normal olmayan hücrede görülen p53 boyanma paternleri olduğundan, bu 2 boyanma paterni bizim çalışmamızda negatif boyanma başlığında birleştirilmiştir. Wild tip boyanan olgular ise pozitif boyanma başlığı altına alınmıştır. Her grupta ayrı ayrı İHK boyanan ve boyanmayan olguların yüzdeleri belirtilmiştir. Bulgular tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Grade gruplar arasında uygulanan İHK paneldeki boyanma durumu

GRADE GRUP	N (%)	BOYANMA DURUMU	p16 n (%)	p21 n (%)	p53* n (%)	p57 n (%)
GRUP 1	29 (27)	Negatif	22 (76)	8 (28)	13 (45)	28 (99)
		Pozitif	7 (24)	21 (72)	16 (55)	1 (1)
GRUP 2	16 (15)	Negatif	11 (69)	4 (25)	6 (38)	16 (100)
		Pozitif	5 (31)	12 (75)	10 (62)	0
GRUP 3	13 (12)	Negatif	5 (38)	2 (15)	3 (23)	12 (99)
		Pozitif	8 (62)	11 (85)	10 (77)	1 (1)
GRUP 4	16 (15)	Negatif	6 (38)	5 (31)	8 (50)	16 (100)
		Pozitif	10 (62)	11 (69)	8 (50)	0
GRUP 5	33 (31)	Negatif	16 (48)	5 (15)	12 (36)	27 (82)
		Pozitif	17 (52)	28 (85)	21 (64)	6 (18)

*p53 İHK boyamasında, pozitif kategoriye wild tip boyanan olgular, negatif kategoriye ise negatif boyanan olgular ile mutant pozitif boyanan olgular dahil edilmiştir.

Çalışmamızda grup 2, grup 3 ve grup 4'te yer alan olgu sayısı istatistiksel analizin doğru çalışması için yeterli bulunmamıştır. Bu nedenle kombine skoru toplamı 7 olan grade grup 2 (3+4) ve grup 3 (4+3) olguları birleştirilmiştir. Grup 4 olguları ise istatistiksel analize katılmamıştır. Böylece grade grup 1, grup 2+3 ve grup 5 olmak üzere 3 grup belirlenmiştir.

Grup 1 ve grup 5'te yer alan olguların İHK boyanma durumu karşılaştırılmıştır. Grup 1'de 7 olgu (%29) p16 pozitif olup, grup 5'te 17 olgu (%71) pozitif olarak saptanmıştır. Grup 1'de 21 olgu (%43) p21 pozitif olup, grup 5'te 28 olgu (%57) pozitif olarak saptanmıştır. Grup 1'de 13 olgu (%52) p53 negatif kategorisinde olup, grup 5'te bu kategoride 12 olgu (%48) mevcuttur. Grup 1'de 1 olgu (%14) p57 pozitif olup, grup 5'te ise 6 olgu (%86) pozitif olarak saptanmıştır.

Grup 1 ve grup 2+3'te yer alan olguların İHK boyanma durumu karşılaştırılmıştır. Grup 1'de 7 olgu (%35) p16 pozitif olup, grup 2+3'te 13 olgu (%65) pozitif olarak saptanmıştır. Grup 1'de 21 olgu (%48) p21 pozitif olup, grup 2+3'te 23 olgu (%52) pozitif olarak saptanmıştır. Grup 1'de 13 olgu (%59) p53 negatif kategorisinde olup, grup 2+3'te bu kategoride 9 olgu (%41) mevcuttur. Grup 1'de 1 olgu (%50) p57 pozitif olup, grup 2+3'te de 1 olgu (%50) pozitif olarak saptanmıştır.

Grup 2+3 ve grup 5'te yer alan olguların İHK boyanma durumu karşılaştırılmıştır. Grup 2+3'te 13 olgu (%43) p16 pozitif olup, grup 5'te 17 olgu (%57) pozitif olarak saptanmıştır. Grup 2+3'te 23 olgu (%45) p21 pozitif olup, grup 5'te 28 olgu (%55) pozitif olarak saptanmıştır. Grup 2+3'te 9 olgu (%43) p53 negatif kategorisinde olup, grup 5'te bu kategoride 12 olgu (%57) mevcuttur. Grup 2+3'te 1 olgu (%14) p57 pozitif olup, grup 5'te ise 6 olgu (%86) pozitif olarak saptanmıştır (Tablo 9).

Tablo 9. Grade grup 1, grup 2+3 ve grup 5 olguları arasında İHK panel boyanma durumu

GRADE GRUP	N (%)	p16 n (%)		p21 n (%)		p53 n (%)		p57 n (%)	
		Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif
GRUP 1	29 (47)	22 (58)	7 (29)	8 (62)	21 (43)	13 (52)	16 (43)	28 (51)	1 (14)
GRUP 5	33 (53)	16 (42)	17 (71)	5 (38)	28 (57)	12 (48)	21 (57)	27 (49)	6 (86)
Toplam n (%)	62 (100)	38 (100)	24 (100)	13 (100)	49 (100)	25 (100)	37 (100)	55 (100)	7 (100)
GRUP 1	29 (50)	22 (58)	7 (35)	8 (57)	21 (48)	13 (59)	16 (44)	28 (50)	1 (50)
GRUP 2+3	29 (50)	16 (42)	13 (65)	6 (43)	23 (52)	9 (41)	20 (56)	28 (50)	1 (50)
Toplam n (%)	58 (100)	38 (100)	20 (100)	14 (100)	44 (100)	22 (100)	36 (100)	56 (100)	2 (100)
GRUP 2+3	29 (47)	16 (50)	13 (43)	6 (55)	23 (45)	9 (43)	20 (49)	28 (51)	1 (14)
GRUP 5	33 (53)	16 (50)	17 (57)	5 (45)	28 (55)	12 (57)	21 (51)	27 (49)	6 (86)
Toplam n (%)	62 (100)	32 (100)	30 (100)	11 (100)	51 (100)	21 (100)	41 (100)	55 (100)	7 (100)

Pearson ki-kare istatistiksel yöntemi ile grup 1 ve grup 5'te yer alan olgular arasında p16, p21 ve p57 İHK boyanması yönünden anlamlı bir ilişki mevcuttur ($p<0.001$, $p=0.007$ ve $p<0.001$). p53 boyanması yönünden anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p=0.203$).

Pearson ki-kare istatistiksel yöntemi ile grup 1 ve grup 2+3'te yer alan olgular arasında p16 ve p53 İHK boyanması yönünden anlamlı bir ilişki mevcuttur ($p=0.001$ ve $p=0.034$). p21 ve p57 boyanması yönünden anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p=0.203$ ve $p=1$).

Pearson ki-kare istatistiksel yöntemi ile grup 2+3 ve grup 5'te yer alan olgular arasında p57 İHK boyanması yönünden anlamlı bir ilişki mevcuttur ($p<0.001$). p16, p21 ve p53 boyanması yönünden anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p=0.321$, $p=0.157$ ve $p=0.395$). Bulgular tablo 10 ve tablo 11'da gösterilmektedir.

Tablo 10. Grup BT'de malign korlarda yer alan grade grup 1, grup 2+3 ve grup 5 tümörleri arasında İHK olarak p16 ve p21 boyanma durumunun karşılaştırılması

GRADE GRUP	p16 (%)		P DEĞERİ	p21 (%)		P DEĞERİ
	(-)	(+)		(-)	(+)	
GRUP 1	58	29	<0.001*	62	43	0.007*
GRUP 5	42	71		38	57	
GRUP 1	58	35	0.001*	57	48	0.203*
GRUP 2+3	42	65		43	52	
GRUP 2+3	50	43	0.321*	55	45	0.157*
GRUP 5	50	57		45	55	

*Pearson ki-kare testi

Tablo 11. Grup BT'de malign korlarda yer alan grade grup 1, grup 2+3 ve grup 5 tümörleri arasında İHK olarak p53 ve p57 boyanma durumunun karşılaştırılması

GRADE GRUP	p53 (%)		P DEĞERİ	p57 (%)		P DEĞERİ
	(-)	(+)		(-)	(+)	
GRUP 1	52	43	0.203*	51	14	<0.001*
GRUP 5	48	57		49	86	
GRUP 1	59	44	0.034*	50	50	1*
GRUP 2+3	41	56		50	50	
GRUP 2+3	43	49	0.395*	51	14	<0.001*
GRUP 5	57	51		49	86	

*Pearson ki-kare testi

5. TARTIŞMA

Prostat kanseri, erkeklerde en sık tanı alan ikinci kanserdir ve 2020’de dünya çapına tahminen 1.4 milyon kişi bu tanıyı almıştır (45, 46). Otopsi çalışmalarındaki verilerin incelenmesi sonucunda 30 yaşın altındaki PKa prevalansının %5 olduğu, her dekatta olasılık oranının (Odds ratio) ortalama 1.7 arttığı ve 79 yaş üstünde %59 prevalansa ulaştığı bildirilmektedir (47).

Afrika kökenli Amerikalı erkekler için insidans oranları beyaz erkeklerle karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu ve ölüm oranlarının beyaz erkeklere göre yaklaşık iki kat fazla olduğu gösterilmiştir (48). Bu eşitsizliğin nedenlerinin; sosyal, çevresel ve genetik faktörlerdeki farklılıklar olduğu düşünülmektedir (49).

Prostat kanserinin etiyolojisi birçok çalışmanın konusudur ve diğer yaygın kanserlere kıyasla net bir sonuca ulaşılamamıştır. Prostat kanseri risk faktörleri ileri yaş, etnik köken, genetik faktörler ve aile öyküsüdür (1,50). Prostat kanseri ile pozitif ilişkili diğer faktörler arasında diyet (doymuş hayvansal yağ ve kırmızı et tüketiminin artması, meyve, sebze, vitamin ve kahve alımının azalması), obezite ve fiziksel hareketsizlik, inflamasyon, hiperglisemi, enfeksiyonlar ve kimyasallara veya iyonize radyasyona maruziyettir (1, 51).

PSA'nın bir serum belirteci olarak kullanılması prostat karsinomu tanısında devrim yaratmıştır (52). PSA, prostat dokusuna özgüdür, ancak kansere özgü değildir; bu nedenle BPH, prostatit ve diğer malign olmayan durumlarda yükselebilir. PSA değerleri hastalıklara özel standardize edilmemiştir (53). Eğer PSA devamlı yükselen bir değerde ise, prostat kanseri olasılığının daha yüksek olduğunu gösterir. Pek çok erkek, düşük serum PSA'sına sahip olmasına rağmen PKa'yı barındırabilir (54).

Çalışmamızda oluşturulan 3 grup vardır. Bunlar kanser grubu, benign grup ve tümör çevresi benign gruptur. Prostat kanseri grubunda ortalama PSA düzeyleri benign gruba göre oldukça artmıştır. Ancak yapılan çalışmalarda PSA'nın benign prostat dokularında da artabileceği, bu durumun prostatın hacmine, hastanın yaşına bağlı olabileceği gösterilmiştir (55). Bu sebeple PSA değerleri daha çok prostat kanseri tanısı almış hastalarda, rekürrens veya metastazı belirlemede takipte kullanılan bir tetkiktir.

Prostat bezi, iç (transizyonel zon) ve dış (periferal ve santral zon) olmak üzere kabaca 2 bölüme ayrılarak incelenebilir. İç kısımda daha çok BPH görülürken, dış kısımda ise daha çok PKa görüldüğü bilinmektedir. Bu nedenle prostatın iç kısmından örnekleme yapan TUR biyopsilerinde PKa tanısı aslında beklenmeyen bir durumdur. Zaten buradan yapılan

biyopsiler kanser tanısı için değil, hastanın idrar yapma sıkıntısını azaltmak veya ortadan kaldırmak için yapılmaktadır. Kanser tanısı için, prostat bezinin dış kısmından örnekleme yapan TRUS biyopsi kullanılmaktadır. TRUS biyopsilerinde kanser görülen olgulara sonraki aşamada radikal prostatektomi yapılmaktadır. Çalışmamızda radikal prostatektomi ve TRUS biyopsi ile tanı alan olgular dahil edilmemiş olup, sadece TUR materyali ile PKa tanısı almış olgular değerlendirmeye alınmıştır. Literatürde, olguları tamamen TUR biyopsilerinden oluşan, İHK boyanma paterninin incelendiği çalışma sayısı oldukça azdır. Buradaki amaç TUR materyallerinde PK tanısı alan olgularda belirlenen İHK panelin boyanma durumunu incelemek, literatürdeki çalışmalarda yer alan boyanma paternlerinden benzer veya farklı olanları tanımlamak ve literatüre katkıda bulunmaktır.

Birinci grupta yer alan her olgudan TMA yöntemi kullanılarak iki kor alınmıştır. Her olguda bir korda PKa alanı, diğer korda ise benign alan yer almaktadır. Bu nedenle bu grup, grup BT olarak kodlanmış olup, burada yer alan benign korlar ayrı bir alt grubu temsil etmektedir. Böylece birinci grupta, oluşturulan benign alt grupla birlikte iki grup yer almıştır. İkinci grupta ise nodüler hiperplazi veya BPH tanısı almış vakalar temsil edilmektedir. Bu nedenle bu gruba grup B kodlaması yapılmıştır.

Çalışmada oluşturulan 3 grupta, hücre siklusunda düzenleyici rolü olan p16, p21, p53 ve p57 proteinlerinin İHK yöntemi kullanılarak ekspresyon farklılıkları incelenmiştir. Üç karşılaştırma yapılmıştır.

Birinci karşılaştırma (tablo 5), grup BT içerisinde yer alan malign ve benign korlar arasında yapılmış olup, gruplar arasında boyanma farklılıkları saptanmıştır. Buna göre p16 ve p21, boyanan vaka sayısı ve boyanma skoru yönünden, malign korlarda benign korlara kıyasla daha yüksek boyanmıştır ($p<0.001$). p53'te mutasyon başlığı altına alınan negatif boyanma, malign korlarda benign korlara kıyasla daha fazladır. Diğer bir mutasyonel boyanma şekli olan mutant pozitif boyanma ise malign korların 13 tanesinde (%12) görülmüş olup, benign korların hiçbirinde izlenmemiştir ($p<0.001$). p57 ile gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p=0.386$)

İkinci karşılaştırma (tablo 6), grup BT'de yer alan malign korlar ile grup B benign veya BPH olguları arasında yapılmıştır. Elde edilen bulgulardaki istatistiksel açıdan anlamlılığın değerlendirilmesinde kullanılan p değeri, birinci karşılaştırma ile benzer sonuç vermiştir. Kanser grubunda p16 ve p21 boyanması BPH olgularına göre daha yüksek olup,

p53 ile mutasyonel boyanma kanser grubunda daha çok izlenmiştir ($p<0.001$). p57 ile gruplar arasında boyanma farklılığı görülmemiştir ($p=0.386$).

p16 proteini hücre siklusunda G1-S geçişinde inhibitör role sahiptir (56). Kanser hücresinde bu noktadan geçen hücre sayısı arttığı için bu proteinler daha çok çalışacaktır. Ancak p16 geninde mutasyon olan hastalarda hiç çalışmayabilir. Bu nedenle kanser dokusunda ekspresyon artışı yanı sıra ekspresyon kaybı da gösterebilir. Kadın genital sistem kanserlerinde, özellikle serviks kanserlerinde p16 ile görülen artmış boyanma, HPV ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca genital kanser tümörlerinde (endometrium ve over kanseri) p16 pozitifliği yüksek gradeli tümörlerde izlenmektedir (57).

PKa olguları ile yapılan farklı bir çalışmada benign alanlarda p16 ekspresyonu görülmemiş olup, kanser dokularında p16 ile boyanma görülmektedir (39). Aynı çalışmada benign olgularda p16 boyanmaması ve PKa olgularında boyanması nedeniyle tanı zorluğu olan olgularda İHK olarak p16 yapılması önerilmektedir. Başka çalışmalarda p16 benign alanlarda az da olsa boyanmakta, ancak kanser alanlarında p16 ile daha yüksek boyanma görülmektedir (58, 59). Prostatektomi materyallerindeki PKa'da, kanser alanı ile kanser çevresi nodüler hiperplazi alanındaki boyanma paternini inceleyen bir çalışmada ise, kanser alanında p16 ile ekspresyon artışı olduğu görülmektedir. Aynı çalışmada TUR materyallerinde, BPH olgularında kanser olgularına göre daha yüksek p16 boyanması saptanmıştır (38). Bu nedenle TUR materyalinde PKa tanısı için p16 yapılması önerilmemiştir. Çalışmamızda İHK boyanma yönünden kanser alanları ile kanser çevresi benign alanlar ve BPH olguları arasındaki karşılaştırmada, TUR materyallerinde, benign alanlarda p16 ile boyanma görülmektedir, ancak kanser alanlarında p16 ile daha yüksek boyanma saptanmıştır. Kanser alanlarında p16 daha yüksek boyanmasına ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmasına rağmen, benign alanlarda da boyanma olduğu için p16 ile kansere spesifik bir boyanma varlığı ispatlanamamıştır. Bu nedenle TUR materyallerinde, PKa tanısı için p16 kullanılması hususunda Remo ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçtan farklı bir çıkarım yapılamamıştır. Kanser alanlarında, benign alanlar veya BPH olgularına kıyasla p16 ile ekspresyon artışının görülmesi literatür ile uyumlu bulunmuştur.

Literatürde PKa olgularında p21 ekspresyonu açısından farklı sonuçlar elde eden çalışmalar yer almaktadır. p21 hücre döngüsünde inhibitör bir protein olduğundan, aktivasyonunun azalması proliferatif süreçleri uyarabilir (60). p21 hücre büyümesi ve diferansiyasyonunu kontrol eden, wild tip p53 ile aktive edilen (mutant tip p53 ile değil)

siklin bağımlı kinaz inhibitör proteinidir (61). Matsushima ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada p53 pozitifliği ile beraber p21 negatifliği PKa'da kötü prognosisla ilişkili bulunmuştur (61). Romics ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada farklı grade ve histolojik tipte PKa'larda 1 olgu dışında p21 ile nükleer boyanma saptanmamıştır (62). Ancak diğer bazı çalışmalarda ise p21 kanser çevresi benign alanlarda hemen hemen hiç boyanmayıp, kanser alanlarında pozitif boyanma göstermiştir (63, 60, 64). Bizim çalışmamızda TUR materyallerinde, İHK boyanma yönünden yapılan ilk iki karşılaştırmada (kanser alanları ile kanser çevresi benign alanlar ve BPH olguları), malign alanlarda p21 ekspresyonu benign alanlara veya BPH olgularına kıyasla daha yüksektir. Ancak PKa alanlarına göre p21 ekspresyonu daha az olmasına rağmen, TUR materyallerinin kanser çevresi benign dokuları ve BPH olgularında da p21 ekspresyonu görülmüştür.

Çeşitli kanserlerde en yaygın görülen anormalliklerden biri p53 proteininde izlenir ve p53 proteininin karsinogeneze önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (65). Wild tip p53 proteininin, tümör hücresi büyümesini baskıladığı bilinmektedir. Bu protein spesifik DNA dizilerine bağlanır ve hücre döngüsü düzenlemesine katılır (66).

p53'ün İHK olarak farklı klonları bulunmaktadır. Prostat kanserinde, çeşitli çalışmalarda DO-7 klonu kullanılmıştır. Bu çalışmalarda boyanma skorlaması negatif, zayıf, orta ve kuvvetli şeklinde değerlendirilmiştir. Çalışmamızda ise günümüzde patoloji pratiğinde kullanılan Bp53-11 klonu kullanılmış olup, olgular wild tip boyanma ve mutasyonel boyanma şeklinde değerlendirilmiştir. Mutasyonel boyanma içerisinde p53 ile negatif olgular ve mutant pozitif olarak ifade edilen kuvvetli nükleer pozitif olgular yer almıştır. Wild tip boyanma p53'ün normal çalıştığının göstergesidir. Mutasyonel boyanma ise başta kanser olmak üzere proliferatif süreçlerde görülebilmektedir. Çalışmamızda TUR materyallerinde, İHK boyanma yönünden yapılan ilk iki karşılaştırmada, malign alanlarda, benign alanlar ve BPH olgularına göre mutasyonel boyanma daha çok görülmüştür. Benign alanlar ve BPH olgularında ise malign alanlara göre wild tip boyanma daha fazla izlenmiştir.

Literatürde PKa'da p53'ün p21 ile korelasyonu inceleyen çalışmalar mevcuttur. Shiraishi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada PKa olgularında, İHK olarak p53 (DO-7) ve p21 ekspresyonları arasında pozitif korelasyon izlenmiştir. Ancak hem p53 hem de p21 ile pozitif immünoreaktiviteye sahip olan bu örneklerde p53 mutasyonu görülmemiştir. Bu durum, p53'ün wild tip olma ve p21 ekspresyonunu indüklemeye ve/veya p21'in muhtemelen p53'ten bağımsız bir yolla indüklenmesi olasılığını düşündürmüştür (67). DiGuseppe ve

arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada pankreas kanserinde, p53 mutasyonu ile beraber p21 kuvvetli ekspresyonu izlenmiş olup, bu durum p21 ekspresyonunun p53'ten bağımsız bir yolakla uyarıldığını düşündürmüştür (68). Matsushima ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada PKa'da İHK boyanma skorları yönünden p21 ve p53 (DO-7) arasında ters ilişki saptanmış olup, bu durum PKa'da p21 ekspresyonunun büyük oranda p53 bağımlı mekanizma ile uyarılması hipotezini desteklemiştir (61). Sasaki ve arkadaşlarının kolorektal kanserlerde yaptığı çalışmada da benzer sonuç alınmıştır (69). Başka bir çalışmada ise PKa'da p21'in p53'e bağlı ekspresyonunu destekleyecek sonuç alınamamıştır (41). Biz çalışmamızda prostat TUR materyallerinde hem PKa olan olgularda hem de benign veya BPH olgularında p21 ve p53 korelasyonunu inceledik. p53 wild boyanan olgularda p21 pozitifliği ve p53 mutasyonel boyanan olgularda p21 negatifliği korelasyon varlığı olarak kabul edilmiştir. Buna göre grup BT benign alanlarında p53 ile wild boyanma gösteren olguların çoğu (%70) p21 ile pozitif boyanmıştır. p53 mutasyonel boyanma gösteren 2 olguda da (%100) p21 negatif sonuç vermiştir. Grup B BPH olgularında ise p53 wild boyanma gösteren olguların çoğu (%65) p21 ile pozitif boyanmış olup, p53 ile mutasyonel boyanma gösteren 11 olgunun 10'u (%91) p21 negatiftir. Çalışmamızda elde edilen bulgular TUR materyallerinde, PKa etrafı benign dokularda ve BPH olgularında, p21 ekspresyonunun p53 bağımlı mekanizma ile uyarılması hipotezini büyük oranda desteklemiştir.

p57, G1 S geçişinde hücre döngüsünü durduran, Siklin E CDK 2 kompleksini inhibe ederek hücre siklusunu düzenleyen diğer bir proteindir. Mishra ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada p57 gen ifadesinde kayıp veya azalmanın prostat kanserine sebep olabileceği ifade edilmektedir (70). Atasoy ve arkadaşları ile Jin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda prostat bezinde p57 ekspresyonu benign alanlar veya BPH alanlarında daha yüksek olmakta; PIN, düşük dereceli PKa ve yüksek dereceli PKa'ya gidişte p57 ekspresyonu azalarak kaybolmaktadır (71, 43). Bizim çalışmamızda TUR materyallerinde kanser çevresi benign alanlar veya BPH olgularında malign alanlara kıyasla p57 ekspresyonu yönünden anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bu nedenle PKa'da, p57 fonksiyonunun azalması ile kansere progresyon gelişebileceği yönündeki teori İHK yöntem ile desteklenememiştir. PKa'da p57'nin etkisi göstermek için başta moleküler düzeyde olmak üzere çok sayıda çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Üçüncü karşılaştırma (tablo 7), grup BT'de yer alan benign korlar ile grup B'de yer alan BPH olguları arasında yapılmıştır. Literatürde TUR materyallerinde PKa olgularında,

kanser çevresi benign alanlar ile BPH olguları arasında İHK boyanma durumunu araştıran çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda gruplar arasında p16 ve p53 ekspresyonları açısından anlamlı bir ilişki bulunmaktadır ($p<0.001$, $p=0.017$). PKa olgularında p16 ekspresyonu arttığı için, kanser çevresi benign alanlar ile kanser ile ilişkisi olmayan BPH olgularında p16'nın nasıl eksprese olacağı araştırılmak istenmiştir. Grup B'deki BPH olgularında p16 ile boyanma yüzdesi, kanser grubundaki benign korlarda görülen boyanma yüzdesine kıyasla daha fazla bulunmuştur. Bu nedenle TUR materyallerinde benign dokularda, İHK olarak p16 boyanması ile kanser gelişimi arasında bir ilişki bulunamamıştır. Kanserle ilişkisi olmayan BPH olgularında p16'nın daha yüksek boyanması, BPH gelişiminde p16'nın daha farklı bir mekanizma ile uyarıldığını düşündürmektedir.

Grup B'deki BPH olgularında mutasyonel boyanmaya işaret eden p53 ile negatif boyanan olgu sayısı, kanser grubu çevresi benign alanlara göre daha fazladır. Bu nedenle TUR materyallerinde benign dokularda, İHK olarak wild boyanma dışı p53 ekspresyonları ile kanser gelişimi arasında bir ilişki bulunamamıştır. Kanser ile ilişkisi olmayan BPH dokularında p53'ün negatif boyanmasına neden olan başka bir mekanizma olduğu düşünülmüştür. McNicol ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada BPH gelişimindeki etyolojik faktörlerden biri olarak HPV gösterilmiştir (18). Bizim çalışmamızda BPH olgularında, kanser etrafı benign alanlara göre izlenen daha yüksek p16 pozitifliği ve p53 mutasyonel negatifliğine, HPV enfeksiyonu neden olmuş olabilir. Bu konuda daha çok çalışma ihtiyacı bulunmaktadır. Gruplar arasında p21 ve p57 ile İHK boyanma skoru ve yüzdesi yönünden anlamlı bir boyanma farklılığı bulunmamaktadır ($p=0.765$, $p=1$). Bu nedenle gruplar arasında p21 ve p57 ile tümörögeneze sebep olma potansiyeli açısından farklılık olup olmadığı değerlendirilememiştir.

Çalışmamızda PKa olgularında İHK olarak p53'ün p21 ile korelasyonu incelenmiştir. p53 ile wild boyanan PKa olgularının %86'sı p21 ile pozitif saptanmıştır. Elde ettiğimiz bulgu TUR materyallerinde PKa tanısı alan ve p53 ile wild tip boyanma gösteren olgularda, p21 ekspresyonunun p53 bağımlı mekanizma ile uyarılması hipotezini desteklemektedir. p53 ile mutasyonel boyanma gösteren olguların %36'sı p21 negatif olup, olguların çoğu (%64) p21 ile pozitif saptanmıştır. p53 mutasyonel boyandığı halde p21'de ekspresyonun görülmesi, TUR materyallerinde PKa tanısı alan ve p53 ile mutasyonel boyanma gösteren olgularda, p21 ekspresyonunun p53'ten bağımsız bir yolak tarafından uyarıldığını göstermektedir.

Sonuçta çalışmamızda, PKa olgularında p53 wild tip boyanma ile p21 ekspresyonu arasında İHK olarak korelasyon saptanmıştır. Ancak p53'ün mutasyonel boyanması ile p21 ekspresyonu arasında korelasyon izlenmemiştir.

p53'te diğer İHK boyalardan farklı olarak mutasyonel boyanma görülmesi, diğer sistem kanserlerinde olduğu gibi daha yüksek dereceli bir tümörü işaret etmektedir (72). Çalışmamızda mutant pozitif boyanma sadece Grup BT malign alanlarda izlenmiş olup, boyanan 13 vakanın 10'u (%77) grade grup 4 (6 olgu) ve grup 5 (4 olgu) olarak sınıflanmıştır. Kalan 2 vaka grup 3 ve 1 vaka da grup 2 tümör olarak saptanmıştır. Burada grade grup 1 tümörlerin hiçbirinde p53 ile mutant pozitif boyanma izlenmemiştir. Mutant pozitif boyanan olguların büyük çoğunluğu yüksek gradeli olduğundan elde ettiğimiz sonuçlar literatürdeki çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur (41, 61, 67).

p53 İHK boyasında bir diğer mutasyonel boyanma şekli olan negatif boyanma, grup BT'de yer alan malign korların 29 tanesinde (%27), benign korların sadece 2 tanesinde (%2) görülmüştür. Malign grupta negatif boyanan 29 olgu grade gruplarına göre incelendiğinde, 13 vaka (%45) grade grup 1'de yer almaktadır. Grade grup 4 ve 5, yüksek gradeli olgular başlığında birleştirildiği halde, burada toplam 10 olgu (%34) yer almıştır. Bizim çalışmamızda p53 İHK boyasında görülen negatif boyanma paterni, bu paternin görüldüğü vakaların çoğunluğunu grade grup 1 vakalar oluşturması nedeniyle, mutant pozitif boyanmadan farklı olarak yüksek gradeli bir tümörü işaret etmemiştir. p53'te görülen wild tip boyanma paterni çeşitli sistemlerde normal dokularda izlenmekle beraber kanserde de görülebilmektedir. Bizim serimizde malign grupta hem wild tip hem de mutasyon tipi boyanma izlenmiştir. Bu açıdan sonuçlar Fadare ve arkadaşlarının endometrial karsinomda p53 boyanma durumunu inceledikleri çalışmasıyla benzer niteliktedir (73).

Literatürde prostat karsinomu tümörögenezinde p57 rolünü inceleyen az sayıda çalışma mevcuttur (43, 70, 71). Bu çalışmalarda prostat bezinde p57 benign alanlarda veya BPH alanlarında, PIN ve PKa alanlarına kıyasla daha yüksek boyanmış olup, boyanma şiddeti kansere ilerledikçe azalmaktadır. Ayrıca PKa'da grade arttıkça p57 ekspresyonu azalarak kaybolmaktadır. Bizim çalışmamızda ise genel olarak tüm gruplarda p57 boyanması az oranda saptanmıştır. Gruplar arasında ayırıcı bir boyanma farklılığı bulunmamıştır. Ancak bizim çalışmamızda grup BT'de yer alan malign korlardaki grade gruplar arasında, p57 İHK boyanması yönünden anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Malign korlarda p57 ile pozitif boyanan 8 olgudan 6'sı (%75) grade grup 5 tümördür. Geri kalan 1 olgu grup 1 ve diğer olgu

grup 3 tümördür. Bu nedenle grade grup 1 ve grup 5 tümörleri arasında p57 İHK boyanması yönünden pearson ki-kare testi ile karşılaştırma yapılmış olup, anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p<0.001$). Dolayısıyla bizim çalışmamıza göre, TUR materyallerinde grup 5 PKa olgularında p57 ekspresyonu benign ve düşük dereceli PKa alanlarına göre artmaktadır. Sonuçta TUR materyallerinde yüksek gradeli PKa olgularında p57 ekspresyonunu uyaran başka bir mekanizma olabilir. Bu konuda daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız İHK panelin grade gruplar arasında boyanma durumu incelenmiştir. Bu nedenle önce grup BT'de yer alan malign korlar grade gruplarına ayrılmıştır. Burada olguların 29 tanesi (%27) grade grup 1'de ve 33 tanesi (%31) grade grup 5'te yer almaktadır. Olgu sayılarının az olması nedeniyle Kombine skor toplamı 7 olan grade grup 2 ve 3'te yer alan olgular birleştirilmiş olup, grup 2+3 olarak kodlanmıştır. Böylece grup 2+3'te yer alan toplam olgu sayısı 29 (%27) olarak saptanmıştır. Başka bir deyişle grup 1 olan olgular iyi diferansiye PKa, grup 2+3 orta derece diferansiye PKa ve grup 5 tümörler de indiferansiye PKa olarak ifade edilmiştir. Grup 4'te yer alan vakalar olgu sayısı az olması nedeniyle istatistiksel analize dahil edilmemiştir.

Literatürde PKa olgularında grade grup ile İHK boyanma durumunu araştıran çok sayıda çalışma mevcuttur. Halvorsen ve arkadaşları ile Jarrard ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalara göre, benign glandlara kıyasla PIN ve PKa olgularında p16 ekspresyonu artmaktadır (58, 59). Ayrıca PKa'larda grade yükseldikçe p16 ekspresyonu artmaktadır (59, 74). PKa'da p21 ekspresyonunu içeren çalışmalar incelendiğinde Lacombe ve arkadaşlarının çalışmasında PKa'da kombine skoru 7'den az olan tümörlerde p21 daha yüksek boyandığı ifade edilmiştir (64). Benzer şekilde Matsushima ve arkadaşlarının çalışmasında p21 iyi diferansiye PKa'da daha yüksek ekspresyon göstermiştir. Aaltoma ve arkadaşlarının çalışmasında ise yüksek dereceli PKa'larda p21 ekspresyonu artmaktadır (63).

Bizim çalışmamızda grup 1 ve grup 5 arasında p16 ve p21 İHK boyanması yönünden anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p<0.001$ ve $p=0.007$). Bulgulara göre PKa'da indiferansiye tümörlerde, iyi diferansiye tümörlere kıyasla İHK olarak p16 ve p21 ile ekspresyon artışı izlenmekte olup, bulgular literatürde yer alan çalışmaların bazılarıyla benzerlik göstermektedir (39, 63). p53 ile gruplar arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p=0.203$). Çalışmamızda PKa'da indiferansiye tümörler ile iyi diferansiye tümörler arasında İHK olarak p53 boyanma paterni yönünden anlamlı bir farklılık izlenmemiştir. p57 ile gruplar arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p<0.001$). Buna göre PKa'da indiferansiye

tümörlerde, iyi diferansiye tümörlere kıyasla İHK olarak p57 daha fazla boyanmaktadır. Bulgular literatürde yer alan az sayıda çalışma ile uyumlu değildir (43, 70, 71).

Sonuç olarak TUR materyallerinde indiferansiye PKa olgularında, iyi diferansiye tümörlere göre p16, p21 ve p57 ekspresyonu artmaktadır. Ancak p53 ile gruplar arasında istatistiksel açıdan boyanma farklılığı bulunamamıştır. Önceki çalışmalara göre p53 boyanmasındaki farklılığın nedeni, bizim çalışmamızda p53'teki negatif boyanmayı mutasyonel boyanma olarak değerlendirmemiz ve p53 negatif olguların daha çok grade grup1'de yer almasıdır.

Bizim çalışmamızda literatürdeki çalışmaların bazılarında farklı olarak orta diferansiye tümör grubu da kıyaslamaya eklenmiştir. Ayrıca p53'ün farklı bir klonu kullanılmış olup, mutasyonel boyanma yapan olgular tanımlanmıştır. Bu nedenle bazı bulgular ile literatürdeki çalışmalardan farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Grup 1 ve grup 2+3 arasında p16 ve p53 İHK boyanması yönünden anlamlı bir ilişki mevcuttur ($p=0.001$ ve $p=0.034$). Buna göre PKa'da orta derece diferansiye tümörlerde iyi diferansiye tümörlere kıyasla p16 İHK boyanması artmaktadır. Ancak mutasyonel p53 boyanması iyi diferansiye tümörlerde daha çok görülmüştür. Gruplar arasında p21 ve p57 yönünden anlamlı bir farklılık yoktur ($p=0.203$ ve $p=1$). Sonuç olarak TUR materyallerinde PKa tanısı alan orta derece diferansiye tümörlerde, iyi diferansiye tümörlere kıyasla p16 ekspresyonu artmakta, ancak p53 mutasyonel boyanma daha az görülmektedir. p21 ve p57 ekspresyonları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Grup 2+3 ile grup 5 arasında p57 İHK boyanması yönünden anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p<0.001$). Ancak gruplar arasında p16, p21 ve p53 yönünden anlamlı bir ilişki mevcut değildir ($p=0.321$, $p=0.157$ ve $p=0.395$). Sonuç olarak TUR materyallerinde PKa tanısı alan indiferansiye tümörlerde, orta diferansiye tümörlere kıyasla p57 ekspresyonu artmaktadır. Ancak p16, p21 ve p53 ekspresyonları arasında farklılık bulunmamıştır.

Literatürde PKa gelişiminde HPV etkisinin araştıran birçok çalışma yer almaktadır. Ancak bu çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bazı çalışmalarda ilişki bulunmuş, bazılarında ise ilişki bulunamamıştır. Örneğin Meksika ve İran'da yapılan iki çalışmada prostat kanseri ile HPV'nin ilişkili olduğu ifade edilmektedir (75, 76). Günümüzde rutin pratikte HPV'nin en çok araştırıldığı yer kadın genital sistem kanserleri olmasına rağmen, HPV son zamanlarda birçok sistem malignitesi ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile HPV pozitif olduğu bilinen, çeşitli sistemlerin tümörlerine sahip hastalarda İHK boyanma profilleri incelenmiştir. İHK olarak birçok farklı boya kullanılmış olup, bir kısmında bizim çalışmamızda olduğu gibi hücre siklus inhibitörlerinden p21 ve p53 kullanılmıştır (77, 78).

Kadın genital sistemin tümörlerinde patoloji pratiğinde sıkça kullanıldığı için, HPV ile ilişkili olan p16 boyanma paterni bilinmektedir. Buna göre rahim ağzı kanserlerinde, yüksek riskli HPV enfeksiyonu olan hastalarda p16'nın blok şeklinde nükleer ve sitoplazmik boyanma yaptığı kabul edilmektedir.

Yapılan çalışmalarda HPV ile enfekte olduğu bilinen olgularda p21 ile değişken boyanma elde edilmiştir (77, 78, 79, 80). Bu nedenle literatüre bakarak p21 açısından kesin bir yorum yapılamamaktadır. Ancak çalışmaların büyük bir kısmında yüksek riskli HPV ile enfekte olan hastalarda p53 ile ya boyanma kaybı görülmüş ya da tamamen negatif boyanma izlenmiştir (77, 78, 81). Bu bilgiler ışığında HPV için İHK olarak boyanma profili belirlersen; p16'da blok şeklinde boyanmaya benzeyen, orta ve üstünde pozitif ekspresyon ile beraber p53'teki negatif boyanma bu açıdan anlamlı görünmektedir. Çalışmamızdaki olgularda HPV-PCR durumu bilinmediğinden sadece İHK boyanma paternine göre olguları HPV ile ilişkilendirmek sağlıklı olmayacaktır. Buna rağmen çalışmamızda kanser grubunda yer alan 13 olguda İHK boyanma profili, literatürden elde ettiğimiz İHK boyanma profiliyle örtüşmektedir. Ancak p16 yönünden HPV ile yüksek ilişkili olduğu düşünülen blok şeklinde boyanma paternine benzemediği için zayıf pozitif olan vakalar çıkarılınca, olgu sayısı 6'ya düşmüştür. İHK boyanma sonucuna ve literatüre göre değerlendirildiğinde, bu olgularda PKa, HPV ile ilişkili görünmektedir. Ancak bulguların desteklenmesi için moleküler testlere ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ

Çalışmamızda TUR materyallerinde PKa alanları, kanser çevresi benign alanlar ve BPH olgularında; p16, p21, p53 ve p57 hücre siklus proteinlerinin İHK yöntem kullanılarak boyanma durumları incelenmiştir. p16 ve p21, kanser çevresi benign alanlar ile BPH dokularının bazılarında herhangi bir spesifik duruma bağlı olmadan boyanma göstermektedir. Buna bağlı olarak bizim çalışmamızda p16 ve p21 ile kansere spesifik boyanma varlığından söz edilememiştir. Bunun sebebi kanser alanlarında daha belirgin olmak üzere hem benign hem de malign grupta boyanmanın olmasıdır. p53 ile mutasyonel boyanma benign alanlara göre kanser olgularında daha fazla görülmüştür. p57 ile benign ve

kanser alanları arasında boyanma farklılığı görülmemiştir. p57 ile kanser alanlarında ekspresyon kaybı görülmediğinden p57'nin kanser oluşumunda inhibitör etkisi İHK boyanma ile ispatlanamamıştır.

BPH olgularında kanser çevresi benign alanlara kıyasla p16 boyanması artmıştır. Ayrıca p53 ile mutasyonel negatif boyanma daha fazla görülmüştür. Bu nedenle TUR materyellerinde benign dokularda (kanser çevresi benign ve BPH olguları) p16 ve p53 boyanması ile kanser gelişimi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. BPH gelişiminde p16'yı uyaran ve p53'te mutasyonel boyanmaya sebep olan başka bir mekanizma bulunabilir. Bunlardan önemli olanlardan bir tanesi tartışmada da değindiğimiz HPV enfeksiyonu olabilir. Bizim çalışmamızda BPH olgularında p16 pozitifliği ve p53 mutasyonel negatifliğine, HPV enfeksiyonu neden olmuş olabilir. Bu konuda daha çok çalışma yapılması gerekmektedir. Benign olgular arasında p21 ve p57 ile boyanma farklılığı bulunmadığı için tümörögenез açısından yorum yapılamamıştır.

Çalışmamızda kanser çevresi benign alanlar ve BPH olgularında İHK olarak p53 ve p21 korelasyonu saptanmıştır. Kanser alanlarının çoğunda p53 wild boyanan olgularda, p21 ekspresyonu izlenmiştir. Bu nedenle kanserde p53 wild boyanması p21 ile korele bulunmuştur. Ancak kanser alanlarında mutasyonel p53 boyanması ile p21 boyanması arasında korelasyon bulunamamıştır. Bu nedenle p53 mutasyonel boyanmasında, p21 ekspresyonunun p53'ten bağımsız bir yolak ile uyarıldığı düşünülmüştür.

p16 ekspresyonu orta derece diferansiye ve indiferansiye kanserlerde, iyi diferansiye kanserlere göre daha yüksek saptanmıştır. p16'ın yüksek dereceli tümörlerde şiddetli yoğunlukta boyanması nedeniyle, yüksek dereceli PKa tanısında AMACR'a alternatif bir İHK boya olabileceği düşünülmektedir. Ancak orta diferansiye ve indiferansiye kanserler arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.

p21 boyanması, indiferansiye kanserlerde iyi diferansiye kanserlere göre daha yüksek saptanmıştır. Ancak iyi diferansiye kanser ile orta diferansiye kanser ve orta diferansiye kanser ile indiferansiye kanser arasında anlamlı bir boyanma farklılığı bulunmamaktadır.

PKa alanları içerisinde p53 ile mutant pozitif boyanan vakaların büyük kısmı grup 4 veya grup 5 tümör olarak saptanmıştır. Bu nedenle çalışmamızda p53 ile mutant pozitif boyanma yüksek dereceli PKa ile ilişkili görülmektedir. Ancak diğer mutasyonel boyanma

şekli olan p53 ile negatif boyanma, daha çok grup 1 PKa olgularında izlenmiştir. Bu nedenle TUR materyallerinde PKa tanısı alan olgularda, mutasyonel olarak p53 negatif boyanması yüksek dereceli kanser ile ilişkili bulunamamıştır. p53 mutasyonel boyanması, iyi diferansiye kanserlerde orta derece kanserlere göre daha fazla saptanmıştır. Ancak iyi diferansiye kanser ile indiferansiye kanser ve orta derece kanser ile indiferansiye kanser arasında p53 ile istatistiksel açıdan anlamlı bir boyanma farklılığı bulunmamaktadır. Çalışmamızda literatürde yapılan çalışmalardan farklı olarak p53 ile negatif boyanmayı mutasyonel boyanma başlığı altına eklememiz ve bu olguların daha çok grup 1 tümör olması nedeniyle, mutant pozitif boyanan olguların büyük kısmı yüksek dereceli olmasına rağmen, p53 mutasyonel boyanması ile yüksek grade ilişkisi istatistiksel olarak gösterilememiştir.

P57 ekspresyonu, indiferansiye kanserlerde iyi ve orta diferansiye kanserlere göre daha yüksek saptanmıştır. Literatüre göre sırasıyla BPH, düşük grade PKa ve yüksek dereceli PKa'ya gidişte p57 ekspresyonunun azaldığı dikkate alındığında, bulgularımız uyumlu bulunamamıştır. Dolayısıyla literatürden elde ettiğimiz p57'nin prostat kanseri oluşumundaki inhibitör etkisi İHK ile açıklanamamıştır. TUR materyalinde indiferansiye PKa'da p57'yi uyaran başka bir mekanizma olabilir. Bu açıdan daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Orta ve iyi diferansiye kanserler arasında p57 ile boyanma farklılığı bulunamamıştır.

Literatür incelendiğinde PKa'yı HPV ile ilişkilendiren çok sayıda çalışma yer almaktadır. HPV birçok kanser gelişiminde rolü olan ve son dönemde önemi artan bir viral etkidir. Hastanemizde molüküler patoloji imkânı olmadığından hastaların HPV ile enfekte olup olmadığı bilinmemektedir. Ancak literatür taraması ile HPV pozitif hastalarda en yaygın görülen İHK profilinin belirlenebileceği düşünülmüştür. Hastaların HPV ile enfekte olup olmadığı bilinmemesine rağmen, sadece İHK yöntemler çaprazlanarak değerlendirilmiş ve TUR materyallerinde insidental olarak saptanan PKa vakalarında HPV etkisi olup olmadığı araştırılmak istenmiştir.

HPV ile ilişkili İHK profili, p16 ile en az orta şiddette, blok şeklinde boyanmaya benzer ekspresyon ve p53 ile negatif ekspresyon olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda bu iki boyanmaya sahip olgular bulunmaktadır. Ancak moleküler test ihtiyacı olduğundan teyit edilememiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol.* 2019 Apr;10(2):63-89. doi: 10.14740/wjon1191. Epub 2019 Apr 20. PMID: 31068988; PMCID: PMC6497009.
2. McNeal JE. The zonal anatomy of the prostate. *Prostate.* 1981;2(1):35-49. doi: 10.1002/pros.2990020105. PMID: 7279811.
3. Fındık Güvendi, G., Toyran, T., Bağcıoğlu, M., Kılıç, Ö., Adalı, Y. "the incidence and significance of incidental prostate carcinoma in transurethral resection (tur-p) materials between 2014 and 2016 at our center". *Medical Sciences* 13 (2018): 19-22
<https://dergipark.org.tr/en/pub/nwsamed/issue/36688/341076>
4. Aaron L, Franco OE, Hayward SW. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urol Clin North Am.* 2016 Aug;43(3):279-88. doi: 10.1016/j.ucl.2016.04.012. PMID: 27476121; PMCID: PMC4968575.
5. Cunha, G.R., Differentiation, <https://doi.org/10.1016/j.diff.2018.08.005>
6. Wilson, J. D. (2011). *The Critical Role of Androgens in Prostate Development. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 40(3), 577–590. doi: 10.1016/j.ecl.2011.05.003
7. Coffey DS. The molecular biology, endocrinology, and physiology of the prostate and seminal vesicles. In: Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, et al, editors. *Campbell's urology*. 6th edition. Philadelphia: WB Saunders; 1991. p. 221–66.
8. Cai Y. Participation of caudal mullerian mesenchyma in prostate development. *J Urol* 2008; 180:1898–903.
9. Levine A, Wang JP, Ren M, et al. Immunohistochemical localization of steroid 5α-reductase 2 in the human male fetal reproductive tract and adult prostate. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:384-9.
10. Gray's basic anatomy, third edition ISBN: 978-0-323-83442-1
11. Netter H. F. *Atlas of Human Anatomy* 4 th ed. ISBN: 978-1-4160-3385-1
12. Ittmann M. Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018 May 1;8(5): a030346. doi: 10.1101/cshperspect. a030346. PMID: 29038334; PMCID: PMC5932577.
13. McNeal JE. Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol.* 1988 Aug;12(8):619-33. doi: 10.1097/00000478-198808000-00003. PMID: 2456702.
14. Abrahamsson PA, Lilja H. Three predominant prostatic proteins. *Andrologia.* 1990;22 Suppl 1:122-31. doi: 10.1111/j.1439-0272.1990.tb02078.x. PMID: 1720287.
15. Madersbacher S, Sampson N, Culig Z. Pathophysiology of Benign Prostatic Hyperplasia and Benign Prostatic Enlargement: A Mini-Review. *Gerontology.* 2019;65(5):458-464. doi: 10.1159/000496289. Epub 2019 Apr 3. PMID: 30943489.
16. Algaba F. Pathophysiology of benign prostatic hyperplasia. *Eur Urol.* 1994;25 Suppl 1:3-5. doi: 10.1159/000475323. PMID: 7507054.
17. Egan KB. The Epidemiology of Benign Prostatic Hyperplasia Associated with Lower Urinary Tract Symptoms: Prevalence and Incident Rates. *Urol Clin North Am.* 2016 Aug;43(3):289-97. doi: 10.1016/j.ucl.2016.04.001. PMID: 27476122.

18. McNicol PJ, Dodd JG. High prevalence of human papillomavirus in prostate tissues. *J Urol*. 1991 Apr;145(4):850-3. doi: 10.1016/s0022-5347(17)38476-8. PMID: 1848641.
19. Bostwick DG, Cooner WH, Denis L, Jones GW, Scardino PT, Murphy GP. The association of benign prostatic hyperplasia and cancer of the prostate. *Cancer*. 1992 Jul 1;70(1 Suppl):291-301. doi: 10.1002/1097-0142(19920701)70:1+<291: aid-cncr2820701317>3.0.co;2-4. PMID: 1376199.
20. Reissigl A, Pointner J, Strasser H, Ennemoser O, Klocker H, Bartsch G. Frequency and clinical significance of transition zone cancer in prostate cancer screening. *Prostate*. 1997 Feb 1;30(2):130-5. doi: 10.1002/(sici)1097 0045(19970201)30:2<130: aid-pros8>3.0.co;2-s. PMID: 9051151.
21. Netto GJ, Âmin MB, Berney DM, Comp rat EM, Gill AJ, Hartmann A, Menon S, Raspollini MR, Rubin MA, Srigley JR, Hoon Tan P, Tickoo SK, Tsuzuki T, Turajlic S, Cree I, Moch H. The 2022 World Health Organization Classification of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Urinary Tract Tumors. *Eur Urol*. 2022 Nov;82(5):469-482. doi: 10.1016/j.eururo.2022.07.002. Epub 2022 Aug 11. PMID: 35965208.
22. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*. 2016 Jul;70(1):106-119. doi: 10.1016/j.eururo.2016.02.028. Epub 2016 Mar 17. PMID: 26996659.
23. Harnden P, Shelley MD, Clements H, Coles B, Tyndale-Biscoe RS, Naylor B, Mason MD. The prognostic significance of perineural invasion in prostatic cancer biopsies: a systematic review. *Cancer*. 2007 Jan 1;109(1):13-24. doi: 10.1002/cncr.22388. PMID: 17123267.
24. Cheng L, Jones TD, Lin H, Eble JN, Zeng G, Carr MD, Koch MO. Lymphovascular invasion is an independent prognostic factor in prostatic adenocarcinoma. *J Urol*. 2005 Dec;174(6):2181-5. doi: 10.1097/01.ju.0000181215.41607.c3. PMID: 16280760.
25. Epstein JI, Egevad L, Âmin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA; Grading Committee. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol*. 2016 Feb;40(2):244-52. doi: 10.1097/PAS.0000000000000530. PMID: 26492179.
26. Epstein JI, Âmin MB, Reuter VE, Humphrey PA. Contemporary Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: An Update With Discussion on Practical Issues to Implement the 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2017 Apr;41(4): e1-e7. doi: 10.1097/PAS.0000000000000820. PMID: 28177964.
27. Epstein JI, Amin MB, Fine SW, Algaba F, Aron M, Baydar DE, Beltran AL, Brimo F, Cheville JC, Colecchia M, Comperat E, da Cunha IW, Delprado W, DeMarzo AM, Giannico GA, Gordetsky JB, Guo CC, Hansel DE, Hirsch MS, Huang J, Humphrey PA, Jimenez RE, Khani F, Kong Q, Kryvenko ON, Kunju LP, Lal P, Latour M, Lotan T, Maclean F, Magi-Galluzzi C, Mehra R, Menon S, Miyamoto H, Montironi R, Netto GJ, Nguyen JK, Osunkoya AO, Parwani A, Robinson BD, Rubin MA, Shah RB, So JS, Takahashi H, Tavora F, Tretiakova MS, True L, Wobker SE, Yang XJ, Zhou M, Zynger DL, Trpkov K. The 2019 Genitourinary Pathology Society (GUPS) White Paper on Contemporary Grading of Prostate Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2021 Apr 1;145(4):461-493. doi: 10.5858/arpa.2020-0015-RA. PMID: 32589068.

28. Paner GP, Gandhi J, Choy B, Amin MB. Essential Updates in Grading, Morphotyping, Reporting, and Staging of Prostate Carcinoma for General Surgical Pathologists. *Arch Pathol Lab Med*. 2019 May;143(5):550-564. doi: 10.5858/arpa.2018-0334-RA. Epub 2019 Mar 13. PMID: 30865487.
29. Siadat F, Sykes J, Zlotta AR, Aldaoud N, Egawa S, Pushkar D, Kuk C, Bristow RG, Montironi R, van der Kwast T. Not all gleason pattern 4 prostate cancers are created equal: A study of latent prostatic carcinomas in a cystoprostatectomy and autopsy series. *Prostate*. 2015 Sep;75(12):1277-84. doi: 10.1002/pros.23009. Epub 2015 May 11. PMID: 25963383.
30. Flood TA, Schieda N, Keefe DT, Breau RH, Morash C, Hogan K, Belanger EC, Mai KT, Robertson SJ. Utility of Gleason pattern 4 morphologies detected on transrectal ultrasound (TRUS)-guided biopsies for prediction of upgrading or upstaging in Gleason score 3 + 4 = 7 prostate cancer. *Virchows Arch*. 2016 Sep;469(3):313-9. doi: 10.1007/s00428-016-1981-2. Epub 2016 Jul 10. PMID: 27394432.
31. Kweldam CF, Wildhagen MF, Steyerberg EW, Bangma CH, van der Kwast TH, van Leenders GJ. Cribriform growth is highly predictive for postoperative metastasis and disease-specific death in Gleason score 7 prostate cancer. *Mod Pathol*. 2015 Mar;28(3):457-64. doi: 10.1038/modpathol.2014.116. Epub 2014 Sep 5. PMID: 25189638.
32. Dinerman BF, Khani F, Golan R, Bernstein AN, Cosiano MF, Margolis DJ, Hu JC. Population-based study of the incidence and survival for intraductal carcinoma of the prostate. *Urol Oncol*. 2017 Dec;35(12): 673.e9-673.e14. doi: 10.1016/j.urolonc.2017.08.015. Epub 2017 Sep 14. PMID: 28919182.
33. Haffner MC, Weier C, Xu MM, Vaghasia A, Gürel B, Gümüşkaya B, Esopi DM, Fedor H, Tan HL, Kulac I, Hicks J, Isaacs WB, Lotan TL, Nelson WG, Yegnasubramanian S, De Marzo AM. Molecular evidence that invasive adenocarcinoma can mimic prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and intraductal carcinoma through retrograde glandular colonization. *J Pathol*. 2016 Jan;238(1):31-41. doi: 10.1002/path.4628. Epub 2015 Oct 14. PMID: 26331372; PMCID: PMC4715537.
34. Murray A. Cell cycle checkpoints. *Curr Opin Cell Biol*. 1994 Dec;6(6):872-6. doi: 10.1016/0955-0674(94)90059-0. PMID: 7880536.
35. Hochegger H, Takeda S, Hunt T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Nov;9(11):910-6. doi: 10.1038/nrm2510. Epub 2008 Sep 24. PMID: 18813291.
36. DiPippo AJ, Patel NK, Barnett CM. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors for the Treatment of Breast Cancer: Past, Present, and Future. *Pharmacotherapy*. 2016 Jun;36(6):652-67. doi: 10.1002/phar.1756. Epub 2016 May 28. PMID: 27087139.
37. Wai KC, Strohl MP, van Zante A, Ha PK Molecular Diagnostics in Human Papillomavirus-Related Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cells*. 2020 Feb 22;9(2):500. doi: 10.3390/cells9020500. PMID: 32098320; PMCID: PMC7072739.
38. Remo A, Pancione M, Zanella C, Manfrin E. p16 Expression in Prostate Cancer and Nonmalignant Lesions: Novel Findings and Review of the Literature. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2016 Mar;24(3):201-6.
39. Zhang Z, Rosen D, Yao JL, et al. Expression of p14arf, p15ink4a, p16ink4a, and DCR2 increases during prostate cancer progression. *Mod Pathol*. 2006; 19:1339–1343.

40. Faith D, Han S, Lee DK, Friedl A, Hicks JL, De Marzo AM, Jarrard DF. p16 Is upregulated in proliferative inflammatory atrophy of the prostate. *Prostate*. 2005 Sep 15;65(1):73-82. doi: 10.1002/pros.20258. PMID: 15880529.
41. Wan Muhaizan WM, Ahmad PK, Phang KS, Arni T. p53 and p21/WAF-1 overexpressions in prostatic adenocarcinoma. *Malays J Pathol*. 2006 Dec;28(2):93-9. PMID: 18376798.
42. Fan GK, Chen J, Ping F, Geng Y. Immunohistochemical analysis of P57(kip2), p53 and hsp60 expressions in premalignant and malignant oral tissues. *Oral Oncol*. 2006 Feb;42(2):147-53. doi: 10.1016/j.oraloncology.2005.06.017. Epub 2005 Oct 24. PMID: 16246616.
43. Jin RJ, Lho Y, Wang Y, Ao M, Revelo MP, Hayward SW, Wills ML, Logan SK, Zhang P, Matusik RJ. Down-regulation of p57Kip2 induces prostate cancer in the mouse. *Cancer Res*. 2008 May 15;68(10):3601-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0073. PMID: 18483241.
44. Vlajnic T, Eppenberger-Castori S, Bubendorf L. Protocols for Tissue Microarrays in Prostate Cancer Studies. *Methods Mol Biol*. 2018; 1786:103-116. doi: 10.1007/978-1-4939-7845-8_6. PMID: 29786789.
45. Culp, M.B., et al. Recent Global Patterns in Prostate Cancer Incidence and Mortality Rates. *Eur Urol*, 2020. 77: 38.
46. IARC, Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2020. [Access date March 2022]. <https://gco.iarc.fr/today/home>
47. Bell, K.J., et al. Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies. *Int J Cancer*, 2015. 137: 1749.
48. Panigrahi GK, Praharaj PP, Kittaka H, Mridha AR, Black OM, Singh R, Mercer R. et al. Exosome proteomic analyses identify inflammatory phenotype and novel biomarkers in African American prostate cancer patients. *Cancer Med*. 2019
49. Ferlay J EM, Lam F, Colombet M, Mery L, Pineros M, Znaor A, Soerjomataram I. et al. Global cancer observatory: cancer tomorrow. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 02 February 2019.
50. Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho SM, Landolph J, Morrison H. et al. Human prostate cancer risk factors. *Cancer*. 2004;101(10 Suppl):2371–2490.
51. Markozannes G, Tzoulaki I, Karli D, Evangelou E, Ntzani E, Gunter MJ, Norat T. et al. Diet, body size, physical activity and risk of prostate cancer: An umbrella review of the evidence. *Eur J Cancer*. 2016; 69:61–69.
52. Stamey, T.A., et al. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med*, 1987. 317: 909. 185
53. Semjonow, A., et al. Discordance of assay methods creates pitfalls for the interpretation of prostatespecific antigen values. *Prostate Suppl*, 1996. 7: 3. 187
54. Thompson, I.M., et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level ≤ 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med*, 2004. 188
55. Esen H. H. Avunduk M. C. Prostat adenokarsinomlarında PSA değerlerinin Gleason Skor ve klinik evre ile ilişkisi. *Genel Tıp Dergisi*, 2007; 17(4):211-216

56. Schwarze SR, Shi Y, Fu VX, Watson PA, Jarrard DF. Role of cyclin-dependent kinase inhibitors in the growth arrest at senescence in human prostate epithelial and uroepithelial cells. *Oncogene*. 2001 Dec 13;20(57):8184-92. doi: 10.1038/sj.onc.1205049. PMID: 11781834.
57. Chiesa-Vottero AG, Malpica A, Deavers MT, Broaddus R, Nuovo GJ, Silva EG. Immunohistochemical overexpression of p16 and p53 in uterine serous carcinoma and ovarian high-grade serous carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2007 Jul;26(3):328-33. doi: 10.1097/01.pgp.0000235065.31301.3'e. PMID: 17581420.
58. Halvorsen OJ, Haukaas S, Høisæter PÅ, Akslen LA. Expression of p 16 protein in prostatic adenocarcinomas, intraepithelial neoplasia, and benign/hyperplastic glands. *Urol Oncol*. 1997 Mar-Apr;3(2):59-66. doi: 10.1016/s1078-1439(97)00038-0. PMID: 21227061.
59. Jarrard DF, Modder J, Fadden P, Fu V, Sebre L, Heisey D, Schwarze SR, Friedl A. Alterations in the p16/pRb cell cycle checkpoint occur commonly in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer Lett*. 2002 Nov 28;185(2):191-9. doi: 10.1016/s0304-3835(02)00282-3. PMID: 12169393.
60. Doganavsargil B, Simsir A, Boyacioglu H, Cal C, Hekimgil M. A comparison of p21 and p27 immunoexpression in benign glands, prostatic intraepithelial neoplasia and prostate adenocarcinoma. *BJU Int*. 2006 Mar;97(3):644-8. doi: 10.1111/j.1464-410X.2006.06054.x. PMID: 16469041.
61. Matsushima H, Sasaki T, Goto T, Hosaka Y, Homma Y, Kitamura T, Kawabe K, Sakamoto A, Murakami T, Machinami R. Immunohistochemical study of p21WAF1 and p53 proteins in prostatic cancer and their prognostic significance. *Hum Pathol*. 1998 Aug;29(8):778-83. doi: 10.1016/s0046-8177(98)90445-2. PMID: 9712417.
62. Romics I, Bánfi G, Székely E, Krenács T, Szende B. Expression of p21(waf1/cip1), p27 (kip1), p63 and androgen receptor in low and high Gleason score prostate cancer. *Pathol Oncol Res*. 2008 Sep;14(3):307-11. doi: 10.1007/s12253-008-9042-z. Epub 2008 Apr 16. PMID: 18415709.
63. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Ala-Opas M, Kosma VM. Prognostic value and expression of p21(waf1/cip1) protein in prostate cancer. *Prostate*. 1999 Apr 1;39(1):8-15. doi: 10.1002/(sici)1097-0045(19990401)39:1<8: aid-pros2>3.0.co;2-n. PMID: 10221260.
64. Lacombe L, Maillette A, Meyer F, Veilleux C, Moore L, Fradet Y. Expression of p21 predicts PSA failure in locally advanced prostate cancer treated by prostatectomy. *Int J Cancer*. 2001 May 20;95(3):135-9. doi: 10.1002/1097-0215(20010520)95:3<135: aid-ijc1023>3.0.co;2-3. PMID: 11307144.
65. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991 Jul 5;253(5015):49-53. doi: 10.1126/science.1905840. PMID: 1905840.
66. Gottlieb TM, Oren M. p53 in growth control and neoplasia. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Jun 7;1287(2-3):77-102. doi: 10.1016/0304-419x (95)00019-c. PMID: 8672531.
67. Shiraishi T, Watanabe M, Muneyuki T, Nakayama T, Morita J, Ito H, Kotake T, Yatani R. A clinicopathological study of p53, p21 (WAF1/CIP1) and cyclin D1 expression in human prostate cancers. *Urol Int*. 1998;61(2):90-4. doi: 10.1159/000030295. PMID: 9873247.
68. DiGiuseppe JA, Redston MS, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. p53-independent expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol*. 1995 Oct;147(4):884-8. PMID: 7573363; PMCID: PMC1871020.

69. Sasaki K, Sato T, Kurose A, Ikeda E. Immunohistochemical detection of p21waf1/cip1/sdi1 and p53 proteins in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections of colorectal carcinoma. *Hum Pathol.* 1996 Sep;27(9):912-6. doi: 10.1016/s0046-8177(96)90217-8. PMID: 8816885.
70. Mishra S, Lin CL, Huang TH, Bouamar H, Sun LZ. MicroRNA-21 inhibits p57Kip2 expression in prostate cancer. *Mol Cancer.* 2014 Sep 12; 13:212. doi: 10.1186/1476-4598-13-212. PMID: 25216674; PMCID: PMC4168249.
71. Atasoy P, Yilmaz E, Bozdogan O, Ayva S, Batislam E. Expression profile and prognostic importance in prostate lesions of the reverse transcriptase component of human telomerase (hTERT) and of cyclin-dependent kinase inhibitor p57 (p57kip2a). *Int Urol Nephrol.* 2009;41(1):55-60. doi: 10.1007/s11255-008-9399-7. Epub 2008 Jun 3. Erratum in: *Int Urol Nephrol.* 2009;41(1):61. PMID: 18521717.
72. Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, Lu D, Marks MA, Shih IeM, Kurman RJ. Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Mod Pathol.* 2011 Sep;24(9):1248-53. doi: 10.1038/modpathol.2011.85. Epub 2011 May 6. PMID: 21552211.
73. Fadare O, Roma AA, Parkash V, Zheng W, Walavalkar V. Does a p53 "Wild-type" Immunophenotype Exclude a Diagnosis of Endometrial Serous Carcinoma? *Adv Anat Pathol.* 2018 Jan;25(1):61-70. doi: 10.1097/PAP.0000000000000171. PMID: 28945609.
74. Iemelynova AA, Grygorenko VM, Cheremuha SV, Romanenko AM. Correlation between histological type and immunohistochemical profile of prostate cancer and gleason scale gradation. *Exp Oncol.* 2009 Dec;31(4):246-9. PMID: 20010526.
75. Medel-Flores O, Valenzuela-Rodríguez VA, Ocadiz-Delgado R, Castro-Muñoz LJ, Hernández-Leyva S, Lara-Hernández G, Silva-Escobedo JG, Vidal PG, Sánchez-Monroy V. Association between HPV infection and prostate cancer in a Mexican population. *Genet Mol Biol.* 2018 Oct-Dec;41(4):781-789. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2017-0331. Epub 2018 Nov 29. PMID: 30508006; PMCID: PMC6415601.
76. Mokhtari M, Taghizadeh F, Hani M. Is prostatic adenocarcinoma in a relationship with Human Papilloma Virus in Isfahan -Iran. *J Res Med Sci.* 2013 Aug;18(8):707-10. PMID: 24379849; PMCID: PMC3872612.
77. Giannoudis A, Herrington CS. Differential expression of p53 and p21 in low grade cervical squamous intraepithelial lesions infected with low, intermediate, and high risk human papillomaviruses. *Cancer.* 2000 Sep 15;89(6):1300-7. doi: 10.1002/1097-0142(20000915)89:6<1300:aid-cnrcr15>3.0.co;2-u. PMID: 11002226.
78. Wang YW, Zhang K, Zhao S, Lv Y, Zhu J, Liu H, Feng J, Liang W, Ma R, Wang J. HPV Status and Its Correlation with BCL2, p21, p53, Rb, and Survivin Expression in Breast Cancer in a Chinese Population. *Biomed Res Int.* 2017; 2017:6315392. doi: 10.1155/2017/6315392. Epub 2017 Dec 20. PMID: 29423411; PMCID: PMC5750508.
79. Huang LW, Seow KM, Lee CC, Lin YH, Pan HS, Chen HJ. Decreased p21 expression in HPV-18 positive cervical carcinomas. *Pathol Oncol Res.* 2010 Mar;16(1):81-6. doi: 10.1007/s12253-009-9191-8. Epub 2009 Aug 6. PMID: 19657726.
80. Hafkamp HC, Mooren JJ, Claessen SM, Klingenberg B, Voogd AC, Bot FJ, Klussmann JP, Hopman AH, Manni JJ, Kremer B, Ramaekers FC, Speel EJ. P21 Cip1/WAF1 expression is strongly

associated with HPV-positive tonsillar carcinoma and a favorable prognosis. *Mod Pathol*. 2009 May;22(5):686-98. doi: 10.1038/modpathol.2009.23. Epub 2009 Mar 20. PMID: 19305381.

81. Murao K, Yoshioka R, Kubo Y. Human papillomavirus infection in Bowen disease: negative p53 expression, not p16(INK4a) overexpression, is correlated with human papillomavirus-associated Bowen disease. *J Dermatol*. 2014 Oct;41(10):878-84. doi: 10.1111/1346-8138.12613. Epub 2014 Sep 9. PMID: 25201325.

