

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**RENAL HÜCRELİ KARSİNOMLARDA FOXO1, ANNEKSİN 2
VE P53 EKSPRESYONUNUN KLİNİKOPATOLOJİK
PARAMETRELER İLE İLİŞKİSİNİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI**

Dr. Raşit AKDENİZ

**UZMANLIK TEZİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Şirin BAŞPINAR**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinasyon
Birimi tarafından 3343-TU1-12 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ISPARTA - 2014

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, yetişmemde büyük emeği olan Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Sema BİRCAN'a ve Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı hocalarımız Doç. Dr. Nermin KARAHAN, Doç. Dr. İ. Metin Çiriş, Yrd. Doç. Dr. Kemal Kürşat BOZKURT'a, çalışmamın her aşamasında ve uzmanlık eğitimim süresince tecrübe, bilgi ve desteğini esirgemeyen tez hocam Yrd. Doç. Dr. Şirin BAŞPINAR'a ve asistanlığım boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma ve laboratuvarında görevli çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca 3343-TU1-12 No'lu Proje ile tezime maddi destek sağlayan Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Dr. Raşit AKDENİZ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR	v
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Böbrek Embriyolojisi, Anatomisi, Histolojisi.....	3
2.1.1. Böbrek Embriyolojisi	5
2.1.2. Böbrek Anatomisi	7
2.1.3. Böbrek Histolojisi	7
2.2. Böbrek Tümörleri ve Sınıflandırmaları.....	8
2.2.1. Renal Hücreli Karsinomların Epidemiyolojisi.....	11
2.2.2. Renal Hücreli Karsinomların Etiyolojisi.....	11
2.2.3. Renal Hücreli Karsinomların Kliniği.....	12
2.2.4. Renal Hücreli Karsinomlarda Evreleme	13
2.2.5. Renal Hücreli Karsinomlarda Derecelendirme	15
2.2.6. Renal Hücreli Karsinomlarda Prognoz	16
2.3. FOXO1	17
2.4. ANNEKSİN 2	19
2.5. p53.....	21
3. MATERYAL ve METOD	22
3.1. Olgu Seçimi.....	Error! Bookmark not defined.
3.2. İmmünohistokimyasal İnceleme	23
3.3. İstatistiksel Değerlendirme.....	24
4. BULGULAR	25
4.1. Klinik ve Histopatolojik Bulgular	25
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	28
4.2.1. Anneksin 2 Ekspresyonu.....	28
4.2.2. FoxO1 ekspresyonu.....	33
4.2.3. p53 ekspresyonu.....	37

4.2.4. İmmünohistokimyasal Belirleyiciler Arasındaki İlişki	42
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	45
ÖZET.....	51
ABSTRACT	52
KAYNAKLAR	53

SİMGELER ve KISALTMALAR

RHK	: Renal Hücreli Karsinom
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
VHL	: Von Hippel Lindau
FOXO	: Forkhead box-containing protein, O-subfamily
IUAC	: International Union Against Cancer
DAB	: Diaminobenzidine
PCR	: Polimeraze Chain Reaction
PanIN	: Pankreas Intraepitelyal Neoplazi
LDH	: Laktat dehidrogenaz
ESR	: Erythrocyte Sedimentation Rate

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Böbrek Tümörlerinin 2004 DSÖ Sınıflaması	8
Tablo 2. Böbrek Tümörlerinin Evrelendirmesi	14
Tablo 3. Renal Hücreli Karsinomların Derecelendirilmesi.....	16
Tablo 4. RHK'lerin klinikopatolojik özellikleri.....	27
Tablo 5. RHK'lerde tümör boyutu ve Fuhrman nükleer derece ilişkisi	28
Tablo 6. Berrak hücreli RHK'lerde Fuhrman nükleer derece ve pT evresi ilişkisi... 28	
Tablo 7. RHK ve nontümöral böbrek olgularında Anneksin ekspresyonunun karşılaştırılması	29
Tablo 8. Anneksin 2 ekspresyon skoru ile klinikopatolojik parametrelerin ilişkisi .. 32	
Tablo 9. RHK ve nontümöral olgular arasında FoxO1 ekspresyon ilişkisi.....	33
Tablo 10. FoxO1 ekspresyon skoru ile klinikopatolojik parametrelerin ilişkisi	36
Tablo 11. RHK ve nontümöral olgular arasında p53 ekspresyonu ilişkisi.....	37
Tablo 12. p53 ekspresyonu ile klinikopatolojik parametrelerin ilişkisi	39
Tablo 13. RHK'de Anneksin 2 ve FoxO1 ekspresyonları arasındaki ilişki	42
Tablo 14. RHK'de Anneksin 2 ve FoxO1 ekspresyon skorları arasındaki ilişki	42
Tablo 15. RHK'de FoxO1 ve p53 ekspresyonları arasındaki ilişki	43
Tablo 16. RHK'de FoxO1 ve p53 ekspresyon skorları arasındaki ilişki.....	43
Tablo 17. RHK'de Anneksin 2 ve p53 ekspresyonları arasındaki ilişki	44
Tablo 18. RHK'de Anneksin 2 ve p53 ekspresyon skorları arasındaki ilişki	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Böbreğin embriyolojik gelişimi.....	7
Şekil 2. Böbreğin komşulukları	5
Şekil 3. Böbrek kesit yüzü	5
Şekil 4. Böbreğin kanlanması	7
Şekil 5. Glomerülün yapısı	8
Şekil 6. FoxO1'in DNA üzerindeki yerleşimi.....	17
Şekil 7. FoxO1'in posttranslasyonel regülasyonu.....	18
Şekil 8. Anneksin 2'nin moleküler görünümü.....	20
Şekil 9. p53'ün moleküler görünümü.....	22

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Normal böbrek dokusunda Anneksin 2 ekspresyonu	30
Resim 2. Anneksin 2 ile nükleer derece 1 olan RHK’de membranöz boyanma	31
Resim 3. Anneksin 2 ile nükleer derece 4 olan RHK’de membranöz ve sitoplazmik boyanma	31
Resim 4. Böbrek dokusunda proksimal tübüllerde yoğun nükleer FoxO1 pozitifliği.....	34
Resim 5. FoxO1 ile nükleer derecesi 2 olan RHK’de yoğun nükleer boyanma.....	35
Resim 6. FoxO1 ile nükleer derecesi 3 olan RHK’de tek tük zayıf nükleer boyanma	35
Resim 7. Normal böbrek dokusunda p53 negatifliği.....	40
Resim 8. p53 ile nükleer derecesi 1 olan RHK’de seyrek nükleer pozitiflik	41
Resim 9. p53 ile nükleer derecesi 3 olan RHK’de yoğun nükleer pozitiflik.....	41

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Böbrek kanserleri, tüm kanserlerin %2'sini oluşturmakta olup, her yıl yaklaşık 190.000 yeni vakaya tanı konulmaktadır (1). Ülkemizde böbrek kanser insidansı erkeklerde %1,7, kadınlarda %1,2 iken, mortalite erkeklerde %1,1 ve kadınlarda %0,8'dir (2). Önceleri tek bir tür olarak kabul edilen renal hücreli karsinom (RHK) günümüzde histolojik, sitogenetik ve moleküler çalışmaların sonucu olarak birbirinden ayrılabilen, morfolojik ve genetik özellikleri arasında sıkı ilişki olan bir tümör grubu olarak kabul görmektedir (3). Her iki cinste de böbrek kaynaklı malignitelerin %90'ını oluşturur (4). Tüm erişkin maligniteleri arasında erkeklerde 12., kadınlarda 17. sıradadır. E/K oranı 1.5/1'dir (5). Olguların %5'inde multisentrik ve %1'inde bilateral tutulum görülmektedir (6).

Görüntüleme yöntemlerindeki gelişmelerle birlikte son yıllarda böbrek kanseri insidansında artış olduğu görülmektedir. Tümörün gerçek insidansında bir değişiklik olmadığı düşünülmekte, ancak gelişen tanı ve görüntüleme yöntemleri ile rastlantısal tanı oranları artmakta ve bu da göreceli olarak insidans artışına sebep olmaktadır (7,8). RHK'lerin tedavisinde esas olan radikal nefrektomidir ancak tümör cerrahi olarak tam çıkarılsa da hematogen metastaz siktir ve hastalığın erken evrelerinde bile olabilir (9). RHK'de sağ kalımı ön görmede en önemli faktör tümör evresidir. Tümör boyutu, histolojik alt tip ve nükleer derece prognostik önemi olan diğer parametrelerdir (10). RHK'lerin derecelendirmesinde Fuhrman ve arkadaşlarının önerdiği sistem en çok kabul gören sistem olmuştur (11).

p53 geni, 53 kDa ağırlığında, 17. kromozomun kısa kolunda (17p13.1) yerleşen tümör supresör gendir (12). Pek çok malignitede p53 proteininin DNA'ya bağlanan kısmında değişiklikler yaratan mutasyonlar bildirilmiştir. Bu değişiklikler uygun bağlanmayı ve hücre siklus regülasyonunu önler ve kontrol edilemeyen hücre büyümesiyle proliferasyon ve maligniteye ilerlemeye yol açar (13). RHK'de p53'ün prognostik rolü tartışmalıdır. Bazı araştırmacılar p53'ün bu hastalarda, hastaliksız yaşam için önemli bir belirleyici olduğunu savunmaktadırlar (14). p53 artışının RHK'de tümör baskılayıcı fonksiyonları olan VHL ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir (15).

FoxO1 proteini, hücre proliferasyonu, hücre döngüsü progresyonu, diferansiyasyon, metabolizma, DNA hasar tamiri ve apoptoz mekanizmalarında görev alır (16, 17). FoxO1 ekspresyonunda azalma, endometrium (18, 19), meme (20), prostat (21) ve böbrek kanserlerinde (22, 23) gösterilmiştir. FoxO1 ile RHK arasında karsinogenez ve prognoz açısından ilişki olduğu düşünülmekle birlikte bu konuda yapılmış çalışma sayısı çok azdır (24).

Anneksin, hücre bölünmesi, apoptoz, büyüme regülasyonu ve düz kaslardaki kalsiyum fonksiyonları ile ilişkili bir proteindir (25,26). Anneksin 2 ekspresyonunun mide (27, 28), meme (29, 30), kolorektal karsinomlar (31), yüksek dereceli gliomlar (32) ve böbrek kanserlerinde arttığı tespit edilmiştir (33).

Berrak hücreli RHK'lerde proksimal tübül epitalinden köken alır (10, 11). Anneksin 2 ve p53 proksimal tübül hücrelerini boyamaz iken, FoxO1 böbrekte sadece proksimal tübül hücrelerinde kuvvetli nükleer immünoaktivite göstermektedir. Anneksin 2'nin ve p53'ün ekspresyonun tümörde arttığı, FoxO1'in ise azaldığı az sayıda yapılan çalışmada gösterilmiştir (15, 22, 23, 33). Fakat bu üç belirtecin birbirleri ile ilişkisini inceleyen araştırma yoktur. Çalışmamızda bu üç belirtecin berrak hücreli RHK'lerde ekspresyonlarını immunohistokimyasal yöntemle araştırıp, histopatolojik parametreler ve birbirleri arasındaki ilişkileri incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek Embriyolojisi , Anatomisi, Histolojisi

2.1.1. Böbrek Embriyolojisi

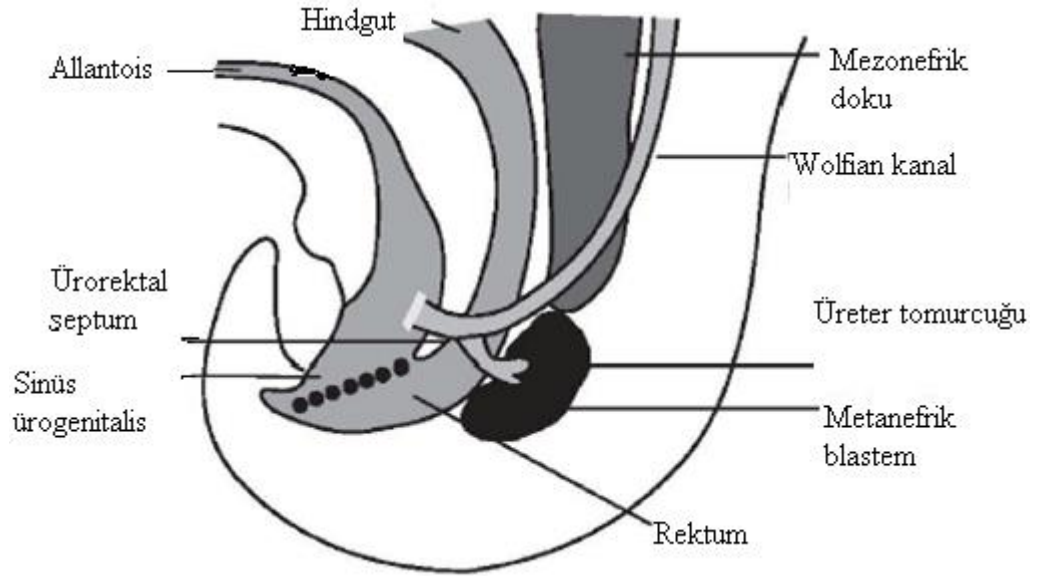
Intrauterin yaşam boyunca birbirinden farklı üç böbrek sistemi ardışık gelişir: Pronefroz, mezonefroz ve metanefroz (34).

Pronefroz: İnsan embriyosunda pronefroz servikal bölgedeki az sayıdaki (7-10 adet) solid hücre topluluğu ve tübüler yapılar tarafından temsil edilir.

Mezonefroz: Pronefrik sistem gerilerken, mezonefroza ait ilk boşaltım tübüleri belirmeye başlar. Bu tübüllerin boyu hızla uzar, S şeklini alır ve medial uzantılarının ucunda bir yapı belirir. Tübülün bu ucundan Bowman kapsülü de gelişir. Kapsül ve glomerül birlikte renal korpuskülü meydana getirir. Tübülüs diğer uca, mezonefrik veya Wolffian kanalı olarak bilinen longitudinal toplayıcı kanalla birleşir. İkinci ayın ortasında mezonefroz orta hattın her iki yanında büyük ve oval şekilli bir organ haline gelir. Bu sırada gelişmekte olan gonad da mezonefrozun medialinde yer aldığından bu iki organ tarafından oluşturulan doku kabarıklığına ürogenital şişlik adı verilir. Kaudaldeki tübüller farklılaşmaya devam ettiğinden kranial tübüller ve glomerüller dejeneratif değişiklikler gösterir ve 2. ayın sonunda tümüyle yok olur. Kaudal tübüllerin bir kısmı ve mezonefrik kanal erkeklerde kalabilirse de kızlarda tümüyle kaybolur (Şekil 1).

Metanefroz (Kalıcı Böbrek): 5. haftada belirir. Yaklaşık dört hafta sonra fonksiyonel hale gelir, metanefrik mezodermden gelişir.

Toplayıcı Sistem: Kalıcı böbreğin toplayıcı sistemi mezonefrik kanalın kloakaya giriş yerinde bir çıkıntı halinde bulunan üreter tomurcuğundan gelişir. Üreter tomurcuğu metanefrik doku içine penetre olur. Penetrasyon sonrasında genişleyen üreter tomurcuğu primitif renal pelvisi oluşturur. Daha sonra da kranial ve kaudal parçalara ayrılarak gelecekteki major kaliksleri meydana getirir. Metanefrik dokuya penetre olan her kaliksten iki yeni tomurcuk gelişir. Bu tomurcuklar 12 ve daha fazla sayıda tübül oluşturana kadar bölünmeye devam ederler. Bu tübüllerin distalinden de 5. ayın sonuna kadar yeni jenerasyon tübüller oluşmaya devam eder.



Şekil 1. Böbreğin embriyolojik gelişimi

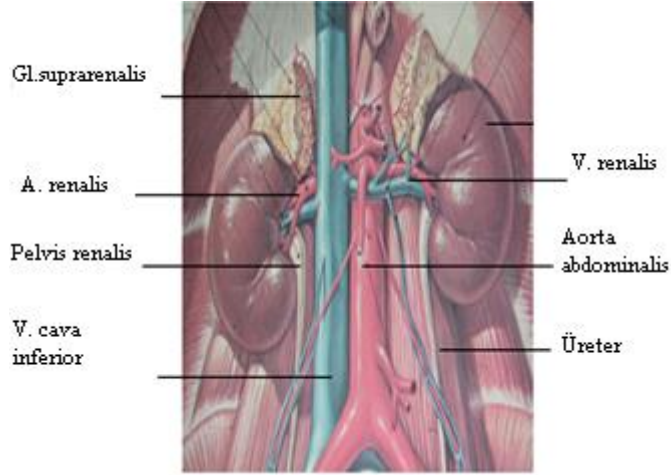
İkinci jenerasyondaki tübüller genişleyerek 3 ve 4. jenerasyon tübülleri absorbe eder ve renal pelvisin minör kalikslerini oluşturur. Gelişimin daha sonraki evrelerinde 5. ve daha sonraki jenerasyon toplayıcı tübüller boyca uzar ve minör kaliksler içine doğru toplanarak renal piramitleri meydana getirir. Üreter tomurcuğundan, renal pelvis, majör ve minör kaliksler ve yaklaşık 1-3 milyon arasında toplayıcı tübül gelişir.

Boşaltım Sistemi: Yeni oluşan her kollektör tübülün distal ucu metanefrik bir doku ile örtülüdür. Bu metanefrik doku içindeki hücrelerden daha sonra küçük tübüller ve renal vezikül olarak bilinen küçük kesecikler meydana gelir. Bu tübüller glomerüllerle birlikte nefronu veya boşaltım birimini oluşturur. Nefronun proksimal ucunda glomerül tarafından yaylandırılmış Bowman kapsülü yer alır. Tübülün distal ucu ise, toplayıcı kanalla ilişkide olacak şekilde açıktır. Glomerülden toplayıcı kanallara bu açıklık yoluyla geçiş vardır. Boşaltıcı tübüllerin uzamaya devam etmesi sonucu proksimal tübüller, Henle kulbu ve distal tübüller meydana gelir.

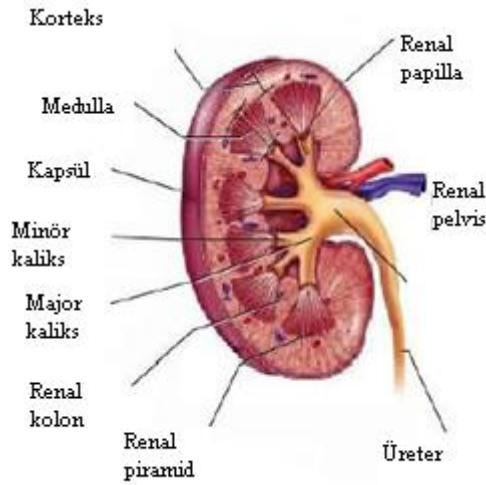
Özetlersek böbrek iki farklı kaynaktan; boşaltım birimlerinin (nefronların) oluştuğu metanefrik mezoderm ve toplayıcı sistemin kaynaklandığı üreter tomurcuğundan (metanefrik divertikül) oluşur. Doğumda böbrekler lobule görünümündedirler (34).

2.1.2. Böbrek Anatomisi

Böbrekler retroperitoneal boşlukta, vertebranın iki yanında, 12. torakal ve 3. lomber vertebral seviye arasında yer alırlar. Karın boşluğunun sağ üst kısmında karaciğerin bulunması nedeniyle sağ böbrek, sol böbreğe göre daha aşağıdadır (Şekil 2). Erişkin böbreklerin ortalama uzunluğu 10-12.5 cm, genişliği 5 cm, kalınlığı 2,5 cm'dir. Ağırlığı yetişkin erkeklerde ortalama 150 gr, kadınlarda 125 gr kadardır (35).



Şekil 2. Böbreğin komşulukları



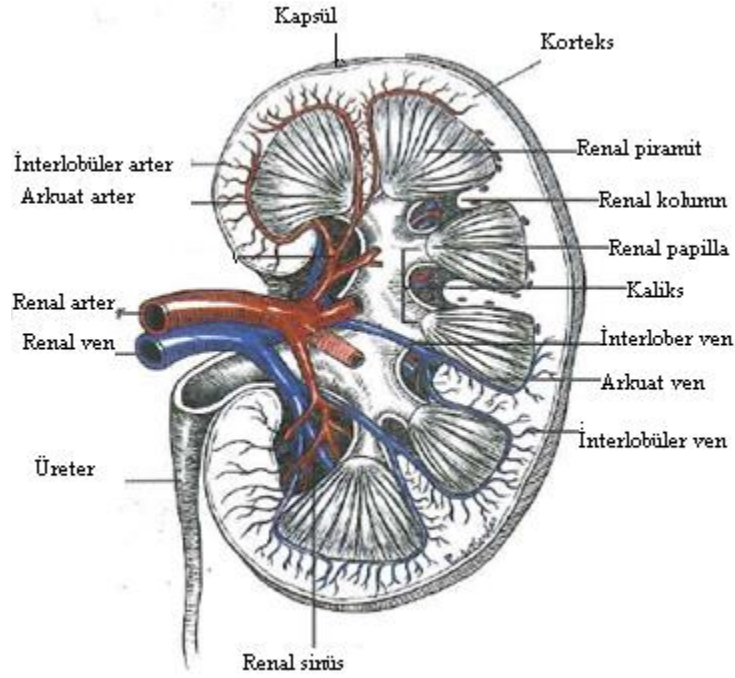
Şekil 3. Böbrek kesit yüzü

Böbreğin kesit yüzünde iç kısımda koyu renkli medulla ve dış kısımda daha soluk renkli korteks izlenir. Tek bir papilla ve onu saran korteks bir lobül olarak adlandırılır. İnsan böbreğinde ortalama 14 lobül vardır (36) .

Böbreğin hilusunda böbreğe giren ve çıkan damar ve sinirler, renal pelvis ve bunların arasını dolduran yağ dokusu bulunur. Böbrek ve sürrenal bezler, Gerota fasyası adı verilen bağ dokudan oluşan bir kapsül ile çevrilidir. Böbrekler dış kısmında korteks, iç kısmında medulla denilen iki ana bölge vardır (Şekil 3). Böbreğin medullasında böbrek piramidleri denen koni biçimli yapılar bulunur. Piramidlerin tabanı korteks ile medulla sınırından başlar ve üreterin huni biçimli üst ucunun devamından oluşan böbrek pelvisinin devamına doğru uzanan papillada son bulur. Pelvisin dış sınırı majör kaliks denilen açık ceplerle aşağı doğru uzanır ve her papillada minör kalikslere ayrılır. Kalikslerin, pelvisin ve üreterlerin duvarları idrarı mesaneye doğru ilerletebilen kasılabilir elemanları içerir (37).

Hilum renale denilen böbreğin orta kısmında önden arkaya doğru v.renalis, a.renalis' in 2- 3. dalı, üreter ve nöral yapılar vardır. Böbreğin dış kısmını içten dışa doğru kapsula fibrosa, kapsula adiposa ve fasya renalis denilen fibröz ve yağ dokusundan oluşan yapılar meydana getirir. Sayıları 4- 14 arasında olan kaliks renalis minorların 2 ya da 3 tanesi bir araya gelerek kaliks renalis majoru oluşturur. İki ya da 3 tane olan kaliks renalis majorların birleşmesi ile de pelvis renalis meydana gelir. Böbreğin kanal sistemine baktığımızda glomerülden süzülen idrarı toplayan Bowman kapsülü vardır. Buradan idrarın süzülerek toplanmasına yardımcı olan proksimal tübül, henle kulpu, distal tübül ve en son olarak toplayıcı kanal yapıları izler. Bu kanal yapıları renal pelviste bir araya toplanır (38).

Böbreğin damar yapısına baktığımızda aorta abdominalisin dalı olan renal arterler böbrek hilusuna gelince 5 adet segmental dala ayrılır. A.segmentalis denilen bu dallar, sinüs renaliste a.interlobaris denilen dallara ayrılır. Bu arterlerde a.arcuata denilen arterleri oluştururlar. Arcuat arterlerden a.interlobularis'ler çıkar. A.interlobularis'lerden yanlara doğru çıkan arteriola glomerularis afferentler glomerul yumağına girerek rete kapillare glomerulareyi oluşturur. Bu yumağın diğer ucundan çıkan arteriola glomerularis efferenteslerin oluşturduğu pleksustan, v.interlobularisler başlar. V.interlobularisler de arterleri takip ederek sırasıyla v. arcuata, v.interlobularis, v.segmentalis ve sonuçta v. renalis olarak v.cava inferiora açılır (Şekil 4) (38). Lenf drenajına baktığımızda, böbrekten çıkan lenf damarları v.renalis'i takip ederek aortanın yan tarafındaki nodi lymphatici lumbales'e açılır (38).

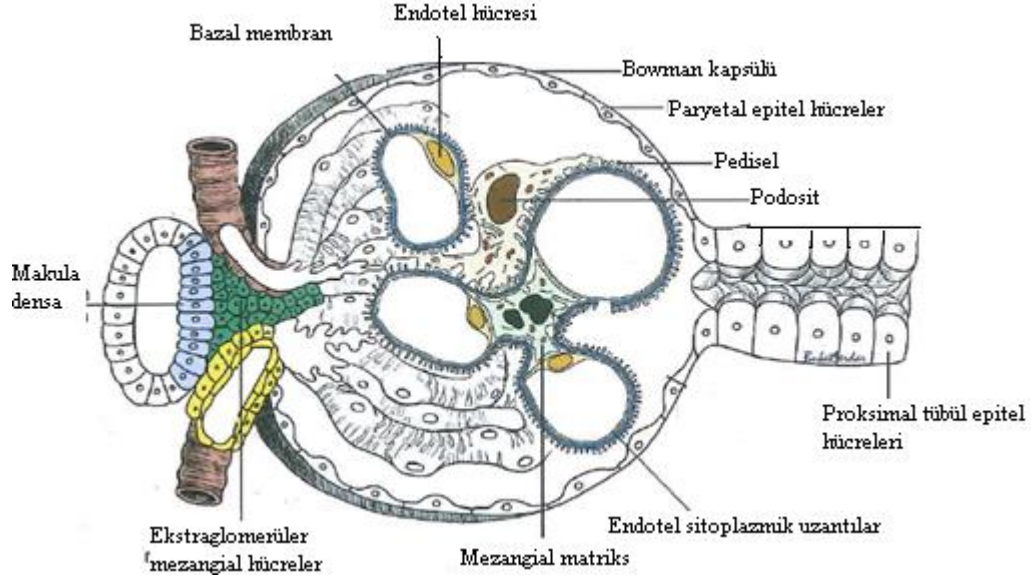


Şekil 4. Böbreğin kanlanması

2.1.3. Böbrek Histolojisi

Böbrek histolojik olarak dışta korteks, içte medulla olmak üzere iki bölüme ayrılır. Nefron ise böbreğin en küçük anatomik ve fonksiyonel birimidir (39). İnsanda her böbrek bir milyon kadar nefrondan oluşur. Bir nefron yaklaşık 50 μm uzunluğundadır. Böbrek hasarı, hastalık veya yaşlanma ile nefron sayısı giderek azalır. 40 yaşından sonra işlev gören nefron sayısı her on yıl için %10 azalır. Her biri kendi başına idrar yapma yeteneğindedir (39). Her nefronun; kandan büyük miktarda sıvının filtre olduğu glomerül ve filtre edilen sıvının idrara dönüştüğü toplayıcı tübül olmak üzere iki ana bölümü vardır. Glomerül, diğer kapiller ağlar ile karşılaştırıldığında, daha yüksek hidrostatik basınca (60 mmHg) sahip olmakla beraber, dallanan ve anastomoz yapan kapiller bir ağdan oluşmuştur. Glomerüller kapillerler epitel hücreleri ile örtülmüştür ve tüm glomerüller Bowman kapsülü ile sarılmıştır. Glomerüller kapillerden filtre olan sıvı Bowman kapsülü içine ve sonra böbrek korteksinde yer alan proksimal tübül içine akar. Sıvı proksimal tübülde böbrek medullasının derinliklerine doğru inen henle kıvrımına akar. Her kıvrımın bir inen bir de çıkan kolu vardır. Çıkan kolun sonunda, duvarında bir plak içeren kısma

Makula Densa denir. Bu kısım nefron fonksiyonunun kontrolünde rol oynar. Sıvı Makula Densa'dan distal tübüle ulaşır. Distal tübülü birleştirici tübül ve kortikal toplayıcı tübül izler. Sıvı buradan kortikal toplayıcı kanala ulaşır. 8-10 adet kortikal toplayıcı kanalın başlangıç kısımları birleşerek, medullada seyreden ve medüller toplayıcı kanal denilen daha geniş bir toplayıcı kanal yaparlar. Toplayıcı kanallar sonunda papillanın tepesi aracılığı ile böbrek pelvisine boşalır (Şekil 5) (40).



Şekil 5. Glomerülün yapısı

2.2. Böbrek Tümörleri ve Sınıflandırmaları

Böbrek kanserleri, tüm kanserlerin %2'sini oluşturmaktadır olup, her yıl yaklaşık 190.000 yeni vakaya tanınmaktadır (1). Türkiye'de böbrek kanser insidansı erkeklerde %1,7, kadınlarda %1,2, mortalite erkeklerde %1,1, kadınlarda %0,8'dir (2). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 2004 yılında böbrek tümörleri şu şekilde sınıflandırılmıştır.

Tablo 1. Böbrek Tümörlerinin 2004 DSÖ Sınıflaması

Renal Hücreli Tümörler

- Papiller adenom
- Onkositom
- Berrak hücreli renal hücreli karsinom

- Multiloküler berrak hücreli renal hücreli karsinom
- Papiller renal hücreli karsinom
- Kromofob renal hücreli karsinom
- Bellini'nin toplayıcı kanal karsinomu
- Böbrek meduller karsinomu Xp11 translokasyon karsinomları
- Nöroblastom ile beraberlik gösteren böbrek karsinomu
- Müsinöz tübüler ve igsi hücreli karsinom
- Renal hücreli karsinom, sınıflandırılmayan

Nefroblastik Tümörler

- Nefrojenik kalıntılar ve nefroblastomatozis
- Nefroblastom
- Kistik parsiyel farklılaşma gösteren nefroblastom

Metanefrik Tümörler

- Metanefrik adenom
- Metanefrik adenofibrom
- Metanefrik stromal tümör

Mezenkimal tümörler

Eriskinde daha sık görülenler;

- Leiomyosarkom
- Anjiosarkom
- Rabdomiyosarkom
- Malign fibröz histiyositom
- Hemanjioperistom
- Osteosarkom
- Anjiomiyolipom
- Leiomyom

- Hemanjiom
- Lenfanjiom
- Jukstaglomerüler hücreli tümör
- Schwannom
- Soliter fibröz tümör
- Renomedüller interstisyel hücreli tümör

Çocuklarda daha sık görülenler;

- Konjenital mezoblastik nefrom
- Berrak hücreli sarkom
- Rabdoid tümör
- Bebeklik çağının kemikleşme gösteren böbrek tümörü

Mikst Mezenkimal ve Epitelyal Tümörler

- Kistik nefrom
- Mikst epitelyal ve stromal tümör
- Sinovyal sarkom

Nöroendokrin Tümörler

- Karsinoid
- Nöroendokrin karsinom
- Primitif nöroektodermal tümör
- Nöroblastom
- Feokromasitom

Hematopoetik ve Lenfoid Tümörler

- Lenfoma/Lösemi
- Plazmasitom

Germ Hücreli Tümörler

- Teratom • Koryokarsinom

2.2.1. Renal Hücreli Karsinomların Epidemiyolojisi

RHK, renal tübül epitelinden kaynaklanan bir grup maligniteye verilen genel isimdir (1). Her iki cinste de böbrek kaynaklı malignitelerin %90'ını oluşturur (4). Tüm erişkin maligniteleri arasında erkeklerde 12., kadınlarda 17. sıradadır. E/K 1.5:1 oranındadır (5). Olguların %5'inde multisentrik ve %1'inde bilateral tutulum görülmektedir (6). Sıklıkla 40 yaşından sonra görülmektedir. 60-70 yaş arasında görülme sıklığı en üst düzeye çıkmaktadır. Fakat çocukluk çağı ve 20'li yaşlarda da nadir olarak görülebilmektedir. Görüntüleme yöntemlerindeki gelişmelerle birlikte son yıllarda böbrek kanseri insidansında artış olduğu görülmektedir. Tümörün gerçek insidansında bir değişiklik olmadığı düşünülmekte, ancak gelişen tanı ve görüntüleme yöntemleri ile rastlantısal tanı oranları artmakta ve bu da göreceli olarak insidans artışına sebep olmaktadır (7). Çocuklarda RHK nadir olarak görülürken, Wilm's tümörü ya da diğer adıyla nefroblastom daha sık izlenir (6). RHK her tür coğrafik bölgede, herhangi bir ırk ayrımı olmadan görülebilir. Erişkin yaşta görülen böbrek tümörlerinin büyük çoğunluğu epitelyal kökenli olup, sarkomlar ve karsinoid tümörler oldukça nadir görülür. Ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans gibi noninvaziv abdominal görüntüleme yöntemlerinin artmasıyla tümörün asemptomatik evrede tanı şansı artmıştır (41). Birinci dereceden yakınlarında RHK saptanan kişilerde bu tümörün gelişme riski 3 kat fazladır. RHK vakalarının %2-4'ü çeşitli herediter kanser sendromları ile ilişkilidir (9).

2.2.2. Renal Hücreli Karsinomların Etiyolojisi

RHK'nın etiyolojisi kesin olarak bilinmemektedir. Etiyolojik faktörler arasında sigara, obesite, hipertansiyon, arsenik, asbestos, kadmiyum, bazı organik solventler, fungal toksinler yer almaktadır. Vücut kitle indeksi fazla olanlarda böbrek kanseri riski yaklaşık iki kat yüksektir. Meslek nedeniyle asbest, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, organik çözücüler ve petrol ürünlerine maruz kalanlarda böbrek kanseri riski artmaktadır. Özellikle erkeklerde izlenen RHK'lerin yaklaşık %30'unda etiyolojide sigara mevcuttur (1). Hemodializ uygulanan hastalar ve böbreğin kazanılmış kistik hastalıklarında da böbrek kanseri gelişme riski arttığı

vurgulanmıştır (42). Renal transplant yapılan hasta gruplarında da değişik risk oranları bildirilmiş olup, bu hastaların ultrasonografi ile takiplerinin rutin olarak uygulanması önerilmektedir (43). Kronik rekürren üriner sistem enfeksiyonu hikayesi olanlarda böbrek kanseri insidansının 1,9 kat arttığı bildirilmektedir (44). Kalıtsal RHK; otozomal dominant geçişlidir (45). Kalıtımsal olan RHK'lerde etiolojide Von Hippel Lindau (VHL), herediter leiomyomatozis, Birt Hogg Dube sendromu, atnalı böbrek, yetişkin polikistik böbrek, tuberoskleroz, nöroblastom, malign lenfomanın rol oynadığı ileri sürülmektedir (6,46). Berrak hücreli karsinomda; 3. kromozomun kısa kolunda DNA kaybı olduğu ve (VHL) tümör baskılayıcı geninin burada lokalize olduğu gösterilmiştir (47). Ancak çoğu RHK'ler ise VHL hastalığı ile ilişkili değildir ve bu sporadik olguların hemen tamamında 3p delesyonu saptanır. Mikroskopik boyuttaki berrak hücreli RHK'lerde bile 3p delesyonu gözlenmiştir (48). Bunların dışında 9p ve 14q kromozom kaybı izlenebilir. Kromozom 9p kaybının kötü prognoz, 14q kaybının hem kötü prognoz, hem de ileri evre ve derece ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Xp11.2 translokasyon/TFE3 gen füzyonlu berrak hücreli RHK, daha çok çocuklarda, genç erişkinlerde ve ileri evrede izlenir. Papiller RHK'de; kromozom 7 ve 17 trizomisi, kromozom 1, 16 ve Y'de anormallikler saptanmıştır (49).

2.2.3. Renal Hücreli Karsinomların Kliniği

Böbreklerin retroperitoneal organlar olması nedeniyle, böbrek tümörlerinin büyük çoğunluğu ilerlemiş evrelerde bile asemptomatik seyredebilir (50). RHK çok değişik semptomlarla kendini gösterebilir. Uzun süre böbrekte sınırlıdır ve işlevsel ya da yapısal bir değişikliğe sebep olmaz. Bu asemptomatik tümörler başka sebeplerle yapılan BT ve MRG ile her geçen gün daha çok saptanmaktadır; dolayısıyla karakteristik bulguları görmek zamanla azalmaktadır (51). Klasik olarak tanımlanan makroskopik hematüri, yan ağrısı ve palpabl kitle triadı sadece %10-15 hastada görülür. Var olan belirti ve semptomlar sıklıkla lokal invazyon veya uzak metastazlarla ilgilidir. Ancak metastatik hastalıkta semptomlar daha sıktır. Kilo kaybı, ateş, halsizlik, bulantı, kusma, gece terlemesi ve hipertansiyon sık rastlanılan semptomlardır (8). Yaklaşık hastaların %33'ünde hipertansiyon izlenmiş ve bu hastaların çoğunda serum renin konsantrasyonu yüksek saptanmıştır (51).

2.2.4. Renal Hücreli Karsinomlarda Evreleme

Tümör evresi, RHK'de bilinen en önemli prognostik faktördür (52). RHK için ilk resmi evreleme sistemi 1958 yılında Flocks ve Kadesky tarafından tümör yayılım paterni ve anatomik özelliklerine göre geliştirilmiştir (53). 1969'da Robson ve arkadaşları vasküler tutulumu da ilave ederek sistemi modifiye etti. Bu evreleme sistemi pek çok klinisyen ve patolog tarafından kullanılmıştır (54). TNM sisteminin ilk versiyonu 1974'te International Union Against Cancer (IUAC)'de tanıtılmıştır (55). İlk olarak 1987'de revize olan sistem, 1997 ve 2002'de yeniden ele alınarak bugün kullanılan halini almıştır (56, 57). Son evreleme sisteminde böbrekte sınırlı tümörler; büyük çapları 4 cm'den küçük ise Evre 1a, 4 cm'den büyük ancak 7 cm'den küçük ise Evre 1b, 7 cm'den büyük ise Evre 2 kabul edildi. Ana toplardamarlara yayılan ya da Gerota fasyasını aşmadan adrenal beze veya perinefrik dokuya invazyon gösterenler Evre 3, Gerota fasyasının sınırlarının ötesine yayılanlar Evre 4 kabul edildi (Tablo 2,3). Son yıllarda yapılan çalışmalarda; Evre 1 tümörlerde 5 yıllık sağkalım %90-100, Evre 2'de %75-90, Evre 3'de %60-70 ve Evre 4'de %15-30 olarak bildirilmiştir (58). Bu evreleme sistemlerinin tümü ancak belirli tümör tiplerinde değerli prognostik bilgiler verir. Örneğin tümör boyutu ve kapsül dışı yayılım kromofob hücreli RHK'de berrak hücreli RHK'de olduğu kadar fazla prognostik öneme sahip değildir. Kromofob hücreli RHK'ler ortalama 8-9 cm çaplarla renal kortikal neoplazilerin en büyükleri olmalarına karşın hastalıksız yaşam oranları yaklaşık % 90'dır. Toplayıcı duktus karsinomlarında ise prognoz kötüdür (59).

Tablo 2. Böbrek Tümörlerinin Evrelendirmesi

T Primer Tümör

TX: Primer tümör değerlendirilemiyor

T0: Primer tümör varlığına dair belirti yok

T1: Tümör en büyük çapı 7 cm ve/veya daha küçük, tümör böbrekte sınırlı

T1a: Tümör böbrekte sınırlı ve en büyük boyutu 4 cm veya daha küçük

T1b: Tümör böbrekte sınırlı ve en büyük boyutu 4 cm'den büyük 7 cm veya daha küçük

T2: Tümör böbrekte sınırlı ve en büyük boyutu 7 cm'den büyük

T3: Tümör büyük venler içine uzanıyor veya doğrudan adrenal bez veya böbrek çevresi dokulara yayılıyor ancak Gerota fasyası dışına çıkmamış

T3a: Tümör adrenal beze veya perinefrik dokuya yayılmıştır ancak Gerota fasyası dışına çıkmamıştır.

T3b: Tümör diafragmanın altında renal vene veya vena cava inferiora yayılmıştır

T3c: Tümör diafragmanın üstünde vena cava inferiora yayılmıştır

T4: Tümör doğrudan Gerota fasyası dışına yayılmıştır

N Bölgesel Lenf Nodları

NX: Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemiyor

N0: Bölgesel lenf düğümlerinde metastaz yok

N1: Tek bir bölgesel lenf düğümünde metastaz var

N2: Birden fazla bölgesel lenf düğümünde metastaz var

M Uzak Metastaz

MX: Uzak metastaz değerlendirilemiyor

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var

Evre I	T1	N0	M0
Evre II	T2	N0	M0
Evre III	T3	N0	M0
Evre IV	T4	N0	M0
	Herhangi T	N1,N2,N3	M0
	Herhangi T	Herhangi N	M1

2.2.5. Renal Hücreli Karsinomlarda Derecelendirme

RHK'lerde nükleer yapıyı değerlendirerek ilk derecelendirmeyi 1971'de Skinner ve arkadaşları yapmışlardır (60). Daha sonra Fuhrman ve arkadaşları bu sistemi geliştirmişlerdir. Bu derecelendirmede tümör hücrelerindeki nükleer boyut, şekil, nükleol belirginliği göz önünde tutulmuş, mitoz bu sistemde değerlendirmeye katılmamıştır (61).

Birçok çalışmada; Fuhrman çekirdek derecelendirmesinin sağkalımı öngörmede anlamlı olduğu ifade edilmiştir (62-66). Gudbjartsson ve arkadaşları (67) tarafından yapılan bir çalışmada, tümör derecesi arttıkça 5 yıllık sağkalım oranının giderek azaldığını tespit edilmiştir. Çalışmada, derece 1-4 tümörler için 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %87,3, %70,5, %45,9 ve %14,9 bulunmuştur (67). Fuhrman'ın sisteminde (Tablo 3) derece 1'de çekirdek yuvarlak, tekdüze, yaklaşık olarak 10 µm çapındadır. Çekirdekçik yoktur ya da çok küçüktür. Derece 2'de çekirdek hafif düzensiz sınırlı, yaklaşık olarak 15 µm çapındadır. Ancak 400 büyütme ile görünen çekirdekçiğe sahiptir. Derece 3'te çekirdek; belirgin derecede düzensiz sınırlı, yaklaşık olarak 20 µm çapındadır. 100 büyütme ile görülebilen büyük çekirdekçiklere sahiptir. Derece 4'te ise çekirdek; derece 3'e benzer. Ancak çok çekirdeklidir ya da garip şekilli olup kromatin kabalaşması görülebilir (67).

Tablo 3. Renal Hücreli Karsinomların Derecelendirilmesi

Grade 1: Nükleus küçük (yaklaşık 10 µm) ve uniform görünümündedir, nükleol yoktur

Grade 2: Nükleus daha büyük (yaklaşık 15 µm) ve sınırları hafif düzensizdir. Küçük nükleol mevcuttur.

Grade 3: Çekirdek daha büyük (yaklaşık 20 µm) ve sınırları daha düzensizdir. Nükleol belirgindir.

Grade 4: Grade 3'teki özelliklere ek olarak çekirdekler pleomorfik veya multilobulardır. Spindle hücreler olabilir veya olmayabilir.

2.2.6. Renal Hücreli Karsinomlarda Prognoz

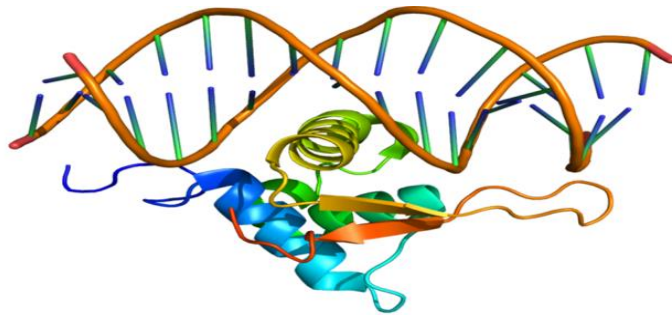
Patolojik tümör (pT) evresi, RHK'de bilinen en önemli prognostik faktördür (52). Tüm malign tümörlerde olduğu gibi, RHK'de de hastalığın seyri tümörün ilk tanı anındaki yayılımı ile ilişkilidir (62). Bununla beraber, prognoz açısından önem taşıyan tümörle ilişkili ve hasta ile ilişkili, laboratuvar ve moleküler bulgular üzerinde çalışmalar yapılmış ve bunlar prognostik faktörler olarak literatüre geçmiştir (62). Nükleer derece, histolojik alt tip ile sarkomatoid alanlar, tümör boyutu, nekroz, toplayıcı sistem invazyonu, kapsül dışına tümör yayılımı, böbrek üstü bezi ve lenf düğümü tutulumu varlığı ve uzak metastaz histopatolojik ve anatomik prognostik belirteçler olarak tanımlanmıştır.

Hastanın yaşı, performans durumu semptomların derecesi, kilo kaybı, kaşeksi, ve genel durumu da seyri etkileyen hasta ile ilişkili diğer faktörlerdir. Laboratuvar bulguları, RHK varlığına özgü olmamakla birlikte yayılım varlığına işaret edebilmektedir (63). Anemi, trombositoz, hiperkalsemi, karaciğer disfonksiyonu, LDH (Laktat dehidrogenaz) ve ESR (Erythrocyte Sedimentation Rate) artması gibi bulgular hastalığın seyrini olumsuz olarak etkiler. CA-9, Ki-67, PCNA, p53, Bcl-2 ve anöploidi varlığı kötü prognostik faktörler olarak bildirilmiştir (58, 68-73).

2.3. FOXO1

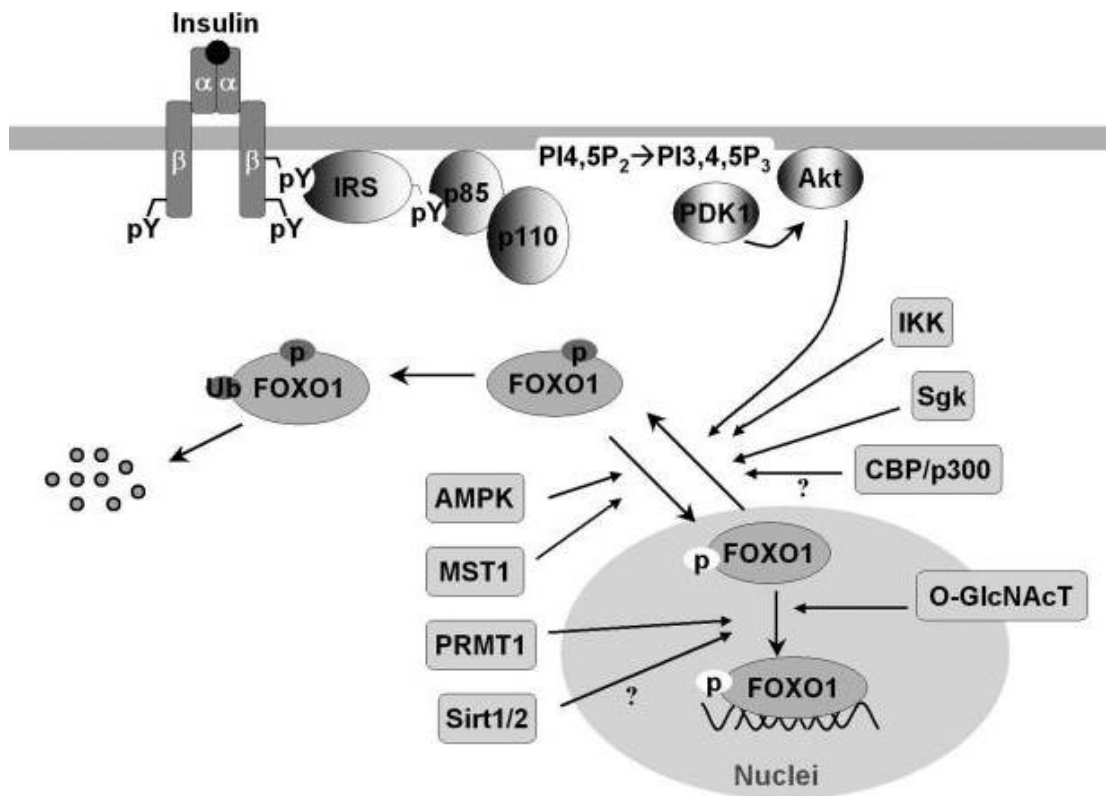
Fox (Forkhead box-containing protein, O-subfamily) proteini ilk olarak *Drosophila melanogaster* adlı bir sinekte Detlef Weigel ve Herbert Jäckle tarafından keşfedilen bir transkripsiyon faktörü ailesidir (74). Fox proteinlerinin belirleyici özelliği DNA'ya bağlanan çatal başı şeklinde bir motif oluşturan 80-100 amino asit dizisinden oluşmasıdır. Bu çatal başı (forkhead) motif protein yapısındaki döngüler kelebek benzeri bir görünüm nedeniyle kanatlı sarmal (winged helix) olarak bilinmektedir (Şekil 6) (75). FoxO özellikle yağ, beyin, kalp, karaciğer, akciğer, over, pankreas, prostat, iskelet kası, dalak, timus ve testis gibi memeli dokularında eksprese edilir (76). FoxO alt ailesi (FOXO1, FOXO3, FOXO4 ve FOXO6) DNA hasar ve tamirine yanıt, apoptoz, metabolizmanın düzenlenmesi, hücre çoğalması, stres toleransı ile ilgili hedef genleri düzenler (77). Aktivitesi insülin tarafından inhibe edilir. Böylece yemek sonrası alınan glukoz oksidasyona veya yağ asidi yapımına gider. Açlık halinde karaciğerde glukoneogenezi uyarır (78). Burada glukoz-6-fosfataz için promotör olarak bulunan insülin cevabı dizisine bağlanır ve transkripsiyon oranını artırır. FoxO1, artan glukoz-6-fosfat transkripsiyon yoluyla, dolaylı olarak hepatik glikoz üretim oranını artırır. Akt tarafından FoxO1 fosforilasyonu, daha sonra glukoz-6-fosfataz transkripsiyonunda bir azalma ile hepatik glikoz üretiminin azalmasına sebep olur (17).

FoxO proteinlerinin transkripsiyon faktörleri olarak, hedef gen ifadesini etkinleştirmek veya bastırmak için DNA'ya bağlanmaları gerekmektedir (79). FoxO proteinler fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon, glikozilasyon dahil olmak üzere birçok posttranslasyonel mekanizmalar ile değiştirilirler (Şekil 7) (80). Değişiklikler sonunda FoxO proteinlerin DNA-bağlanma özellikleri ve transkripsiyonel aktiviteleri değişir.



Şekil 6. FoxO1'in DNA üzerindeki yerleşimi

FoxO1 proteini, hücre proliferasyonu, hücre döngüsü progresyonu, diferansiyasyon, metabolizma, DNA hasar tamiri ve apoptoz mekanizmalarında görev alan ve bir transkripsiyon faktörü olan Fox (Forkhead box-containing protein, O-subfamily) ailesinin bir üyesidir (16). FoxO1 ekspresyonunda azalma, endometrium (18, 22), meme (20), prostat (21) ve böbrek kanserlerinde (22, 23) gösterilmiştir. Zhou ve arkadaşları (24) çalışmalarında, RHK'nin farklı histolojik alt tiplerinde FoxO1 ekspresyon kaybının yaygın olduğunu ve özellikle berrak hücreli alt tipinde prognozun uygun bir habercisi olduğunu tespit etmişlerdir.



Şekil 7. FoxO1'in posttranslasyonel regülasyonu

2.4. ANNEKSİN 2

Anneksinler, ilk olarak 1977’de keşfedilen intrasellüler membranlarla ilişkili bir grup protein ailesinin ortak ismidir (Şekil 8) (81). Hücre içerisinde hücre bölünmesi, apoptoz, veziküllerin taşınması, kalsiyum sinyalizasyon ve büyüme regülasyonu gibi pek çok hücrel fonksiyonları vardır. Anneksinler, hücre şekli değişikliklerine çatı sağlamak gibi, çeşitli hücrel ve fizyolojik süreçlerde önemlidir. Anneksinler, hücre dışında da saptanmıştır. Fibrinoliz ve pıhtılaşma ile bağlantılı oldukları, inflamasyon ve apoptozda da görev aldıkları tespit edilmiştir (26, 82). Yapılan bazı çalışmalara anneksinlerin çeşitli malignitelerde farklı şekilde eksprese olduklarını göstermiştir. Meme, mide, pankreas gibi tümörlerde aşırı eksprese olurken, prostat adenokarsinomunda ekspresyon kaybı göstermektedirler (83). Ayrıca Anneksin proteinlerini kodlayan genlerin kromozomlardaki yerleşimleri ve kanserlerdeki ekspresyon kayıplarının, bu genlerin tümör baskılayıcı genler olabileceği yönünde iddialara sebep olmuştur (83, 84).

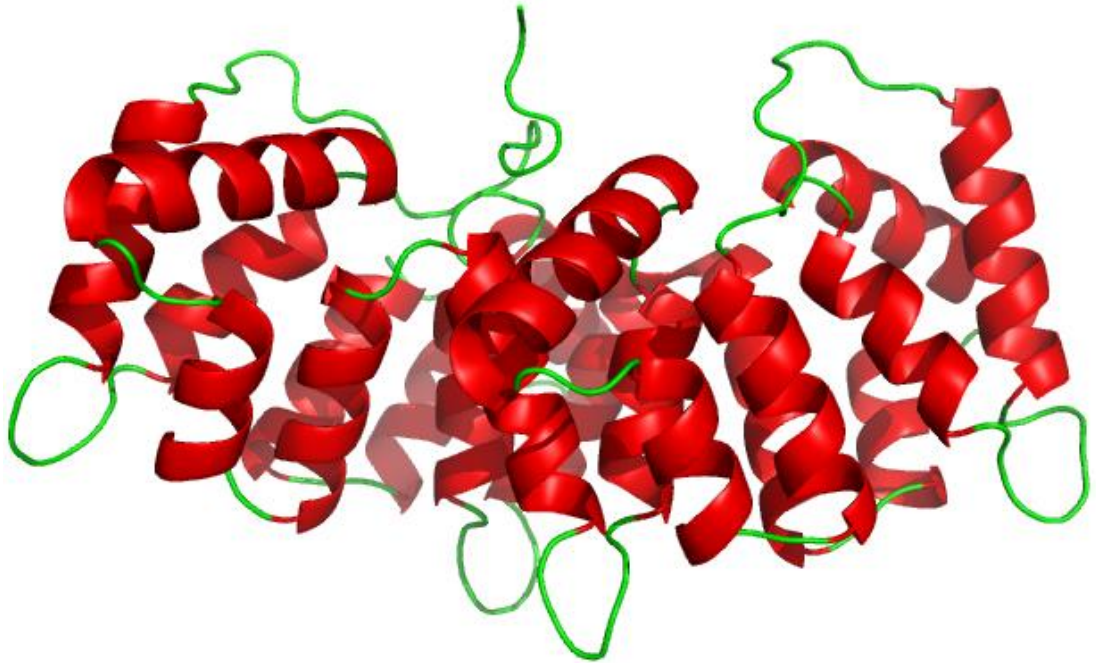
Anneksinler temel olarak iki ana yapıdan oluşmaktadır. Değişken amino-terminal uç; protein ligandları ile iletişimini sağlarken, sabit karboksi- terminal uç ise kalsiyum ve membran bağlanmalarını oluşturmaktadır. Anneksinler, A’dan E’ye kadar beş gruba ayrılmışlardır. Anneksin A, omurgalılarda ve insanlarda bulunmaktadır. Anneksin B, C, D ve E ise mantar, küf, bitki ve metazoan gibi omurgasızlarda tespit edilmiştir (83, 84). Anneksin A2 artan ekspresyonu mide kanseri (85), kolorektal kanser (31), pankreas kanseri (86), meme kanseri (30), yüksek dereceli gliom (32), RHK (87) ve vasküler tümörler (88) olmak üzere pek çok tümör çeşidinde tespit edilmiştir. Buna karşılık, prostat adenokarsinomunda Anneksin A2 ekspresyonunda azalma bildirilmiştir (89). Anneksin A2 ekspresyonu, konvansiyonel RHK’de çalışılmış ve tümör derecesi ile Anneksin A2 ekspresyonu arasında ilişki tespit edilmiştir. Fuhrman derece 1, berrak hücreli RHK’de Anneksin A2 ile zayıf membranöz boyanma varken, derece 3 ve 4’te kuvvetli sitoplazmik ve membranöz boyanma dikkati çekmiştir (87).

Hücre yüzeyindeki Anneksin A2’nin, tümör invazyonu ve metastazında etkili olan proteazlar (katepsin B, plazminojen ve doku plazminojen aktivatörü) ve ekstrasellüler matriks proteinleri (tip 1 kollajen ve tenaskin C) için reseptör bağlayıcı

protein olarak işlev gördüğü gösterilmiştir (90, 91). Pankreatik karsinogenez üzerinde yapılan çalışmalarda, Anneksin A2 ilişkili proteazların tümör hücrelerinin birbirinden ayrılmasında, invazyon yapmasında ve hareketlenmelerinde etkili oldukları vurgulanmıştır (86). Tümör hücreleri üzerindeki Anneksin A2'ye plazminojen aktivatörleri bağlanmakta ve bu plazmin oluşumuna dolayısı ile tümör hücre invazyonuna sebep olmaktadır. Ayrıca Anneksin A2 anjiostatin için de bir reseptör vazifesi görmektedir. Bunun da anjiogenez ve metastazda etkili olduğu, bloke edilmesi durumunda yeni anti-anjiogenik tedavilere ışık tutacağı ifade edilmektedir (92).

Anneksin A2'nin prostat tümörlerine etkisi üzerine yapılan çalışmaların sonuçları çelişkilidir. Yapılan in vitro çalışmalar prostat kanser hücrelerinin yüzeyindeki Anneksin A2'nin inhibisyonunun hücrelerin invazyon kapasitesini azalttığını göstermiştir (93). Başka bir çalışmada ise tümör hücrelerinde Anneksin ekspresyonunun tümör invazyon kapasitesini azalttığı saptanmıştır (89).

Anneksinlerin hücre sinyal yolları, tümör invazyonu, hücre hareketliliği, metastaz, anjiogenez, apoptoz ve ilaç direnci gibi tümör oluşumu ve gelişiminde çeşitli rolleri vardır (94). Anneksinlerin tümörlere özgü ekspresyon paternleri vardır. Tanı, tedavi ve prognozu öngörmeye potansiyel belirteçler olabilecekleri bildirilmiştir (94).



Şekil 8. Anneksin 2'nin moleküler görünümü

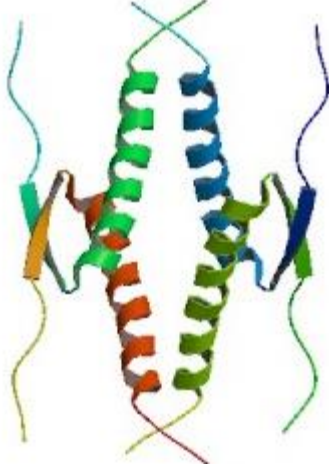
2.5. p53

p53 geni, 53 kDa ağırlığında, 17. kromozomun kısa kolunda (17p13.1) yerleşen tümör supresör genidir (12). İlk tanımlandığı yıllarda sadece bir onkogen olarak görev yaptığı düşünülen p53 geninin daha sonraki çalışmalarda birçok tümörde mutasyona uğrayan bir tümör baskılayıcı gen olduğu kanıtlanmıştır (95). Hücrede “genin gardiyanı” olarak kabul edilir (96-98). G1 fazında hücre büyümesini frenlemek, apoptoz yoluyla hücre ölümünü sağlamak, hücre diferansiyasyonunu indüklemek gibi hücre siklusunda önemli fonksiyonları vardır (99). p53 geni, DNA replikasyonu, hücre proliferasyonu ve hücre ölümünü kontrol eder. Normal p53 geni (wild tip) genetik hasar taşıyan hücrelerin çoğalmasını önleyen nükleer bir fosfoproteini kodlar. Fizyolojik koşullarda p53 proteininin 6–20 dakika gibi kısa bir yarı ömrü vardır ve normal hücre bölünmesi için gerekli değildir. Hücre kimyasal madde, radyasyon gibi mutajenik ajanlarla karşılaştığında DNA’da bir zedelenme olursa, p53 proteininde değişiklikler olur ve normalde çok kısa yarı ömürlü olan p53 stabilize olarak hücre nukleusunda birikir. Biriken normal p53 DNA’da spesifik bölgelere bağlanır ve hücre siklusunun G1 fazında duraklamasını sağlayarak DNA’nın onarılması için hücreye zaman tanımış olur. Eğer bu süre içinde DNA onarımı yapılamazsa p53 DNA hasarı içeren bu hücrelerin proliferasyonunu engelleyerek hücre ölümüne neden olur ve bu şekilde genetik hasarın yeni nesil hücrelere aktarılmasını engeller (100, 101). p53’ün hücre siklus regülasyonu, apoptoz, gelişim, farklılaşma, gen amplifikasyonu, DNA rekombinasyonu, kromozomal ayrışma ve hücre yaşlanma gibi olaylarda rolü olduğu gösterilmiştir (102, 103). p53 amino-terminal transaktivasyon alanı, santral DNA-bağlayıcı alan ve karboksi-terminal oligomerizasyon alanı içerir. p53’ün hücre siklusunu durdurucu fonksiyonu için transkripsiyonel aktivitesine ihtiyacı vardır. p53 transkripsiyondan bağımsız olarak apoptozu indükleyebilir (104).

Pek çok malignitede p53 proteininin DNA’ya bağlanan kısmında değişikliklere sebep olan mutasyonlar bildirilmiştir. Bu değişiklikler uygun bağlanmayı ve hücre siklus regülasyonunu önler ve kontrol edilemeyen hücre büyümesiyle proliferasyon ve maligniteye ilerlemeye yol açar. Son çalışmalar p53 mutasyonlarının artmış tümör anjiogenezi ile ilişkili olduğunu da göstermektedir

(105). p53'teki mutasyonlar proteinin yarı ömrünü uzatır. Bu durum immunhistokimyasal çalışmalar ile belirlenebilecek yüksek miktarlarda proteinin hücre içi birikimine sebep olur. Bunun bir sonucu olarak, p53 proteininin immunhistokimyasal tespitinin, mutasyona uğramış p53 genleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir (106).

p53'ün RHK için prognostik bir belirteç olarak kullanılması tartışmalıdır (14, 107). Girgin C. ve arkadaşlarının (14) çalışmasında, p53 ekspresyonu ile evre ve metastaz arasında ilişki tespit edilmiştir. p53 eksprese eden olguların yaşam sürelerinin, etmeyenlere göre belirgin olarak azaldığı tespit edilmiştir. Bir çalışmada p53 ekspresyonunda artışın RHK'de tümör baskılayıcı fonksiyonları olan VHL ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmaya göre klinik ve farklı moleküler belirleyiciler ile çalışılan RHK olgularında tek değişkenli ve çok değişkenli analizler p53'ün nükste önemli ve bağımsız moleküler belirleyici olduğunu göstermiştir (15).



Şekil 9. p53'ün moleküler görünümü

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Olgu Seçimi

Çalışmaya Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2007-2012 yılları arasında tanı almış 70 RHK berrak hücreli tip olgusu dahil edildi. Ayrıca nonfonksiyone böbrek nedeni ile rezekte edilen 10 adet böbrek dokusu kontrol grubu olarak kullanıldı. Olguların formalin fikse parafine gömülü blokları ve H&E boyalı preparatları arşivden çıkarılarak tekrar değerlendirildi. Arşivden çıkarılan H&E boyalı preparatlarda histolojik derece, patolojik tümör evresi tekrar değerlendirildi. Olguların evresi 2002 TNM evreleme sistemi, derecesi Fuhrman dereceleme sistemine göre yapıldı.

3.2. İmmunohistokimyasal İnceleme

Seçilen parafin bloklardan immünohistokimyasal inceleme için lizinli lamlara 5 µm kalınlıkta kesitler alındı ve immünohistokimyasal FoxO1, Anneksin 2 ve p53 boyama işlemleri uygulandı.

- Parafin kesitler 60 derecedeki etüvde 1 saat bekletildi.
- Ksilende iki kez 15'er dakika bekletildi.
- Absolü alkolden iki kez 10'ar dakika geçirilerek dehidrate edildi.
- Preparatlar distile suyla yıkandı.
- Antijen retrieval aşaması uygulandı (PT modulle cihazında Citrate Buffer içinde pH=6'da 98°C'de 20 dakika ısıtıldı).
- Distile suda yıkandı.
- Kesitler immunhistokimyasal boyama için VENTANA BenchMark XT tam otomatik boyama cihazına konuldu.
- Boyama işlemi IVIEW DAB detection Kit (sekonder antikor: Biotinylated ve strepavidin HRP) ile prosedür uygulanarak boyama yapıldı
- Boyama işlemi bittikten sonra kesitler cihazdan alındı.

- Çeşme suyunda yıkandı.
- Artan konsantrasyonlardaki alkollerden (70°, 80°, 96°) geçirilerek rehidratasyon yapıldı.
- Ksilenle yıkandı.
- Mounting medium kullanılarak kapatıldı.

Negatif kontrol için kesitlere primer antikor yerine dilüent solüsyon damlatılarak immünohistokimyasal boyama işlemi yapıldı. FoxO1 için meme karsinomu, Anneksin 2 için malign melanom, p53 için kolon karsinomu pozitif kontrol olarak kullanıldı.

FoxO1: Tümör hücrelerinde nükleer boyanma pozitif olarak kabul edildi. Zhou ve arkadaşlarının kullandığı yöntem modifiye edilerek, tümör hücrelerinde boyanma yoğunluğu ve boyanma oranı ayrı ayrı değerlendirildi. Değerlendirmeyi kolaylaştırma açısından, boyanma oranı %0=0, %1=1, %2-10=2, %11-30=3, %31- 60=4, %61-100=5 olarak skorlandı. Boyanma yoğunluğu ise hiç boyanma yoksa=0, zayıf boyanma=1, orta derecede boyanma=2, kuvvetli boyanma=3 olarak skorlandı. Toplam skor (yoğunluk + boyanma oranı); hiç boyanma yoksa (-), 1- 2 ise 1+, 3-8 ise 2+ olarak değerlendirildi (24).

Anneksin 2: Tümör hücrelerinde hiç boyanma yok ise (-), sadece membranöz boyanma olması 1+, membranöz ve sitoplazmik boyanma olması 2+ olarak değerlendirildi (87).

p53: Tümör hücrelerinde nükleer boyanma pozitif olarak kabul edildi. Hiç boyanma yoksa (-), %10'dan az boyanma varsa 1+, %10-50 arasında boyanma varsa 2+, %50'den fazla boyanma varsa 3+ olarak skorlama yapıldı (108, 109).

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

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

4. BULGULAR

4.1. Klinik ve Histopatolojik Bulgular

Çalışmamız 70 berrak hücreli RHK olgusunu ve 10 nontümöral böbrek dokusunu içermektedir. Tablo 4'te görüldüğü gibi tümörlü olgularda ortalama yaş $62,8 \pm 12,4$ (34-86) iken tümörsüz olgularda ortalama yaş $43,6 \pm 13,1$ (21-80)'dir. RHK olgularının 43'ü (%61,4) erkek, 27'si (%38,5) kadındır. Olguların 59'u (%84,2) radikal, 11'i (%15,7) parsiyel nefrektomi materyallerine ait olup bu materyallerin 42'si (%60) sağ, 28'i (%40) sol böbrek dokusuna aitti. Kontrol grubunun tamamı nonfonksiyone böbrek nedeni ile opere olan olgulara ait basit nefrektomi materyellerinden oluşmaktaydı (Tablo 4).

Olgularımızın tamamı DSÖ 2004 histolojik derecelendirme sistemine göre sınıflandırılan berrak hücreli RHK'lerdir. Patolojik tümör evreleme (pT) sistemine göre olgularımızın 15'i (%21,4) pT1a, 28'i (%40) pT1b, 8'i (%11,5) pT2a, 3'ü (%4,3) pT2b, 15'i (%21,4) pT3a, 1'i (%1,4) pT3b iken çalışmamızda pT3c ve pT4 olgu bulunmamaktadır. İstatistiksel analizi kolaylaştırmak amacı ile pT1a, pT1b evreleri pT1, pT2a, pT2b evreleri pT2 ve pT3a, pT3b evreleri pT3 olarak gruplandırıldı. Fuhrman nükleer dereceleme sistemine göre olguların 4'ü (%5,7) derece 1, 40'ı (%57,1) derece 2, 16'sı (%22,8) derece 3, 10'u (%14,2) derece 4'tür .

Olgularımızda minimum tümör boyutu 1,9 cm, maksimum tümör boyutu 13,8cm olup, ortalama tümör boyutu 5,9 cm'dir. Tümörlerin 48'i (%68,6) 4cm'den küçük olup, 18'i (%25,7) 4 ile 7cm arasında iken, 4'ü (%5,7) 7cm'nin üstündedir. Tümör boyutu ve Fuhrman nükleer derecesi karşılaştırıldığında, nükleer derecesi 1 olan tümörlerin tamamının boyutu 4cm'den küçüktür. Nükleer derecesi 4 olan olan 3 (%30) olgu 4cm'den küçük olup, 6 (%60) olgu 4-7cm iken 1 (%10) olgu 7cm'den büyüktür. Tümör boyutu ile Fuhrman nükleer derece arasında anlamlı bir ilişki saptandı (Pearson Ki kare, $p=0,039$) . Aynı zamanda iki parametre arasında pozitif korelasyon bulundu (Spearman, $p=0,01$, $r= 0,411$) (Tablo 4).

Olguların 8'inde (%11,4) lenfovasküler invazyon, 10'unda (%14,2) perirenal yağ doku invazyonu, 5'inde (%7,1) renal sinüs invazyonu vardır. Bu parametreler ile Fuhrman nükleer derecesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır ($p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p=0,08$ sırasıyla). Gerota fasyası invazyonu olan olgumuz yoktur. Olguların 4'ünde nefrektomi ile birlikte sürrenal doku eksizyonu yapılmış olup, bu dokularda invazyon görülmedi. Histolojik dereceleme ile pT evreleme sistemi karşılaştırıldığında Tablo 6'da görüldüğü gibi pT1 tümörlerin 4'ü (%9,3) derece 1, 31'i (%72) derece 2, 6'sı (%13,9) derece 3, 2'si (%4,6) derece 4'tür. pT3 tümörlerin 3'ü (%18,75) derece 2, 6'sı (%37,5) derece 3, 7'si (%43,7) derece 4 iken histolojik derece 1 olan olgu yoktur. Olgularımızda Fuhrman nükleer derece ile pT evresi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki (Pearson Ki kare, $p<0,0001$) (Tablo 6) ve ayrıca pozitif korelasyon saptandı (Spearman, $p<0,0001$, $r=0,549$).

Tablo 4. RHK'lerin klinikopatolojik özellikleri

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

Tablo 5. RHK'lerde tümör boyutu ve Fuhrman nükleer derece ilişkisi

		Tümör boyutu			P
		≤4cm n (%)	4-7cm n (%)	>7cm n (%)	
Fuhrman nükleer derece	Derece 1	4 (100)	0 (0)	0 (0)	p=0,039
	Derece 2	32 (80)	7 (17,5)	1 (2,5)	
	Derece 3	9 (56,2)	5 (31,2)	2 (12,6)	
	Derece 4	3 (30)	6 (60)	1 (10)	

Tablo 6. Berrak hücreli RHK'lerde Fuhrman nükleer derece ve pT evresi ilişkisi

		Toplam	Fuhrman nükleer derece				P
			Derece 1 n (%)	Derece 2 n (%)	Derece 3 n (%)	Derece 4 n (%)	
pT evresi	pT1	43	4 (9,3)	31 (72)	6 (13,9)	2 (4,6)	p<0,0001
	pT2	11	0 (0)	6 (54,5)	4 (36,3)	1 (9)	
	pT3	16	0 (0)	3 (18,75)	6 (37,5)	7 (43,7)	

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.2.1. Anneksin 2 Ekspresyonu

Anneksin 2 ile normal böbrek dokusunda Bowman kapsülü, glomerüler yumak, distal tübüller, toplayıcı kanallar ve endotel hücrelerinde sitoplazmik ve membranöz boyanma saptanırken, proksimal tübüllerde boyanma izlenmedi (Resim 1). Normal böbrek dokularının 7'si (%70) negatif ve 3'ü (%30) pozitif iken tümörlerin 68'i (%97,1) pozitif, 2'si (%2,8) negatifti. Tümöral ve nontümöral olgular arasında Anneksin ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (Fisher's Exact Test, p<0,0001) (Tablo 7).

Tablo 7. RHK ve nontümöral böbrek olgularında Anneksin ekspresyonunun karşılaştırılması

	Toplam	Anneksin ekspresyonu		p
		(-)	(+)	
Nontümöral böbrek	10	7 (70)	3 (30)	p<0,0001
RHK	70	2 (2,8)	68 (97,1)	

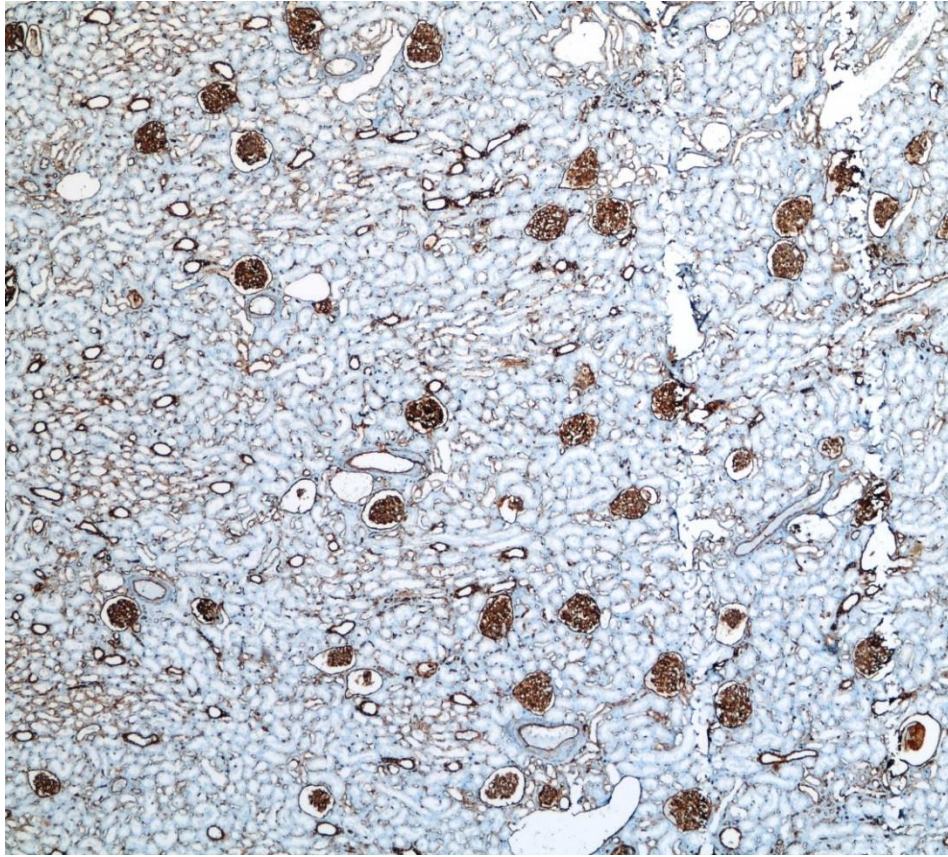
Tümör hücrelerinde Anneksin ekspresyonu boyanma skoruna göre; 47 (%67,1) olguda 1+ ve 21 (%30) olguda 2+ olarak dağılım göstermekteydi (Resim 2-3). RHK'de Anneksin 2 ekspresyon skoru ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki incelenmiş Tablo 8'de özetlenmiştir. Anneksin 2 ekspresyon skoru ile Fuhrman nükleer derecesi karşılaştırıldığında nükleer derecesi 1 olan 1 (%25) olguda boyanma izlenmedi, 3 (%75) olguda 1+ ekspresyon izlendi. Derece 1 olup boyanma skoru 2+ olan olgu yoktur. Nükleer derecesi 2 olan 1 (%2,5) olguda boyanma izlenmezken, 38 (%95) olguda 1+, 1 (%2,5) olguda 2+ ekspresyon izlendi. Nükleer derecesi 3 olan 6 (%37,5) olguda 1+, 10 (%62,5) olguda 2+ boyanma görüldü. Nükleer derecesi 4 olan olguların tamamı 2+ boyanma gösterdi. Anneksin 2 ekspresyon skoru ile nükleer derece arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı (Pearson Ki kare, $p=0,001$) (Tablo 8). Bununla birlikte Spearman korelasyon testi ile Anneksin 2 ekspresyon skoru ve Fuhrman nükleer derecesi arasında pozitif korelasyon saptandı ($p<0,0001$, $r=0,798$).

pT evresi ile Anneksin 2 ekspresyon skoru incelendiğinde; pT1 olan 1 (%2,3) olguda Anneksin 2 ile boyanma izlenmezken, 37 (%86) olgu 1+, 5 (%11,6) olgu 2+ ekspresyon gösterdi. pT2 olan 1 (%9) olguda boyanma izlenmezken, 6 (%54,5) olgu 1+, 4 (%36,3) olgu 2+ ekspresyon gösterdi. pT3 olan 4 (%25) olgu 1+, 12 (%75) olgu 2+ boyanmaya sahipti. Anneksin 2 ekspresyon skoru ile pT evreleme arasında anlamlı bir ilişki saptandı (Pearson Ki kare, $p<0,0001$). Aynı zamanda iki parametre arasında pozitif korelasyon bulundu (Spearman, $p<0,0001$, $r=0,520$).

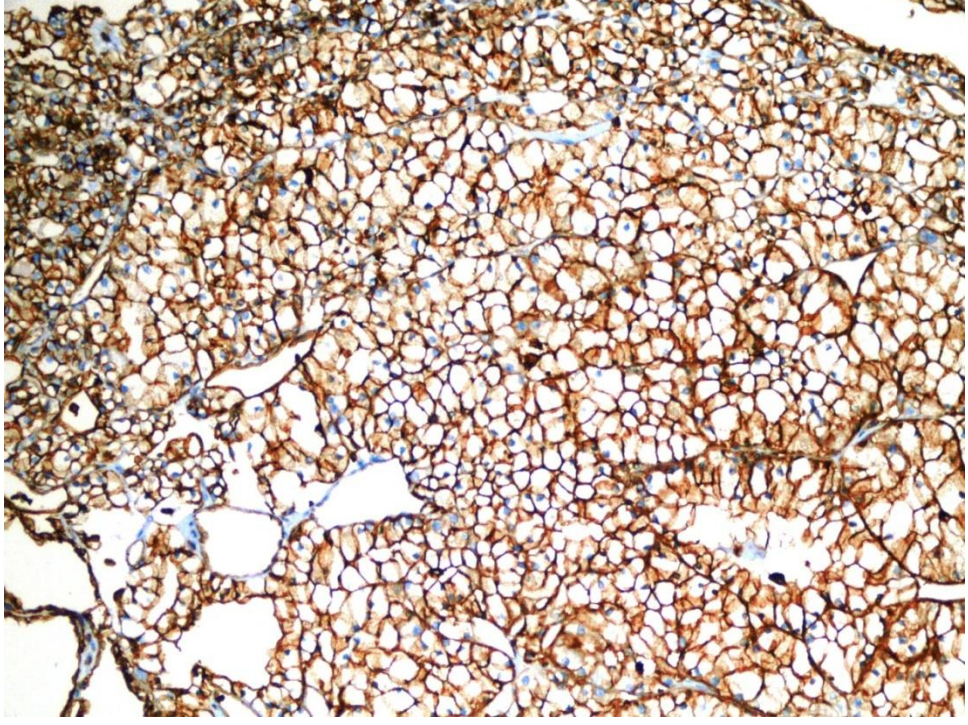
Lenfovasküler invazyon ile Anneksin 2 ekspresyon skoru incelendiğinde; lenfovasküler invazyonun olduğu 7 (%88,5) olguda 2+ boyanma izlenirken, lenfovasküler invazyonun olmadığı 14 (%22,5) olguda 2+ boyanma izlendi.

Anneksin 2 ekspresyon skoru ile lenfovasküler invazyon arasında anlamlı bir ilişki saptandı (Pearson Ki kare, $p=0,001$).

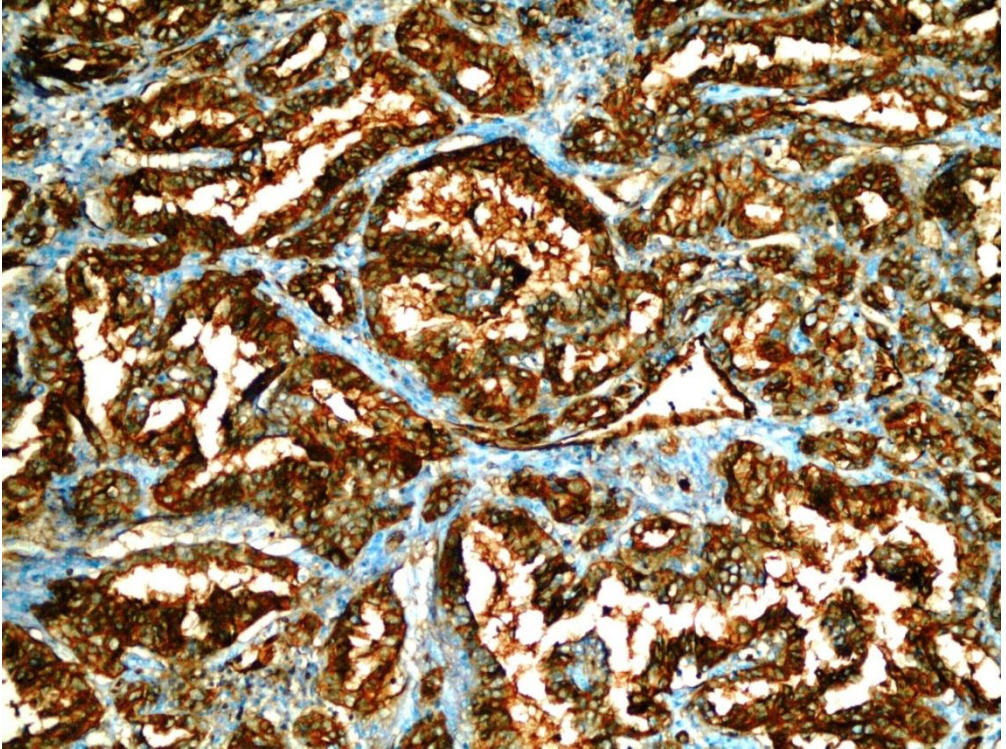
Tümör boyutu ile Anneksin 2 ekspresyon skoru incelendiğinde; 4 cm'den küçük tümörlerin 9'unda (%18,7) 2+ boyanma izlenirken, 7 cm'den büyük tümörlerin 2'sinde (% 50) 2+ boyanma vardır. Anneksin 2 ekspresyon skoru ile tümör boyutu arasında anlamlı bir ilişki tespit edildi (Pearson Ki kare, $p=0,033$). Anneksin 2 ekspresyon skoru ile cinsiyet ve yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı (Pearson Ki kare, $p>0,05$) (Tablo 8).



Resim 1. Normal böbrek dokusunda Anneksin 2 ekspresyonu (DAB x40).



Resim 2. Anneksin 2 ile nükleer derece 1 olan RHK'de membranöz boyanma (DAB x100).



Resim 3. Anneksin 2 ile nükleer derece 4 olan RHK'de membranöz ve sitoplazmik boyanma (DAB x200).

Tablo 8. Anneksin 2 ekspresyon skoru ile klinikopatolojik parametrelerin ilişkisi

		Anneksin 2 ekspresyon skoru				p
		Toplam	(-) n (%)	1+ n (%)	2+ n (%)	
Cinsiyet	E	43	0 (0)	29 (67,4)	14 (32,6)	p=0,180
	K	27	2 (7,4)	18 (66,6)	7 (25,9)	
Yaş	<60	12	1 (8,3)	8 (66,6)	3 (25)	p=0,247
	≥60	58	1 (1,7)	39 (67,2)	18 (31)	
Fuhrman nükleer derece	Derece 1	4	1 (25)	3 (75)	0 (0)	p=0,001
	Derece 2	40	1 (2,5)	38 (95)	1 (2,5)	
	Derece 3	16	0 (0)	6 (37,5)	10 (62,5)	
	Derece 4	10	0 (0)	0 (0)	10 (100)	
pT Evresi	pT1	43	1 (2,3)	37 (86)	5 (11,6)	p<0,0001
	pT2	11	1 (9)	6 (54,5)	4 (36,3)	
	pT3	16	0 (0)	4 (25)	12 (75)	
	pT4	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Lenfovasküler invazyon	Var	8	0 (0)	1 (12,5)	7 (88,5)	p=0,001
	Yok	62	2 (3,2)	46 (74,1)	14 (22,5)	
Tümör boyutu	≤4 cm	48	1(2,1)	38(79,2)	9(18,7)	p=0,033
	4-7 cm	18	1(5,5)	7(38,9)	10(55,6)	
	>7 cm	4	0(0)	2 (50)	2(50)	

4.2.2. FoxO1 ekspresyonu

FoxO1 ekspresyonu, nontümöral böbrekte proksimal tübül hücrelerinde nükleer immünoaktivite olarak saptandı (Resim 4). Berrak hücreli RHK'lerde tümör hücrelerinde nükleer boyanma gösterdi (Resim 5-6). Nontümöral olguların 9'u (%90) pozitif, 1'i (%10) negatiftir. Tümöral olguların 54'ü (%77,2) pozitif, 16'sı (%22,8) negatiftir. İki grup arasında FoxO1 ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Fisher's Exact Test, $p=0,680$) (Tablo 9).

Tablo 9. RHK ve nontümöral olgular arasında FoxO1 ekspresyon ilişkisi

	Toplam	FoxO1 ekspresyonu		P
		(-) n (%)	(+) n (%)	
Nontümöral böbrek	10	1 (10)	9 (90)	p=0,680
RHK	70	16 (22,8)	54 (77,2)	

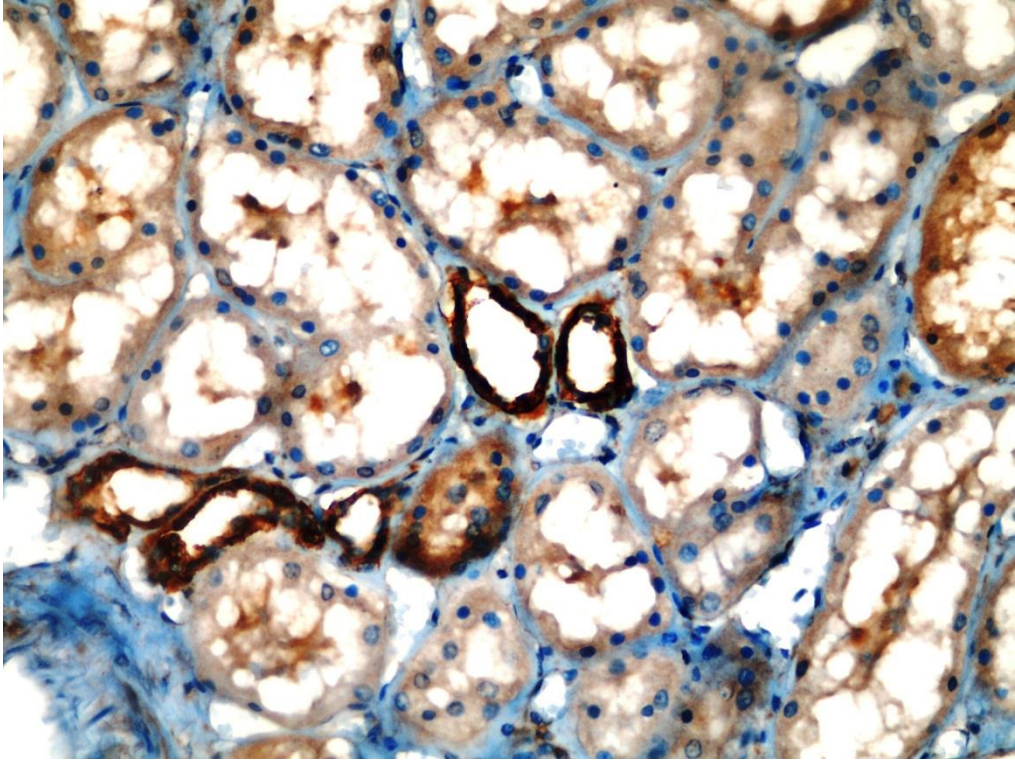
RHK'de FoxO1 ekspresyon skor dağılımına göre; 16 (%22,8) olguda boyanma izlenmezken, 24 (%34,2) olgu 1+, 30 (%42,8) olgu 2+ ekspresyon gösterdi. RHK'de FoxO1 ekspresyon skoru ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki incelenmiş Tablo 10'da özetlenmiştir. FoxO1 ekspresyon skoru ile Fuhrman nükleer derecesi karşılaştırıldığında nükleer derecesi 1 olan 2 (%50) olguda 1+, 2 (%50) olguda 2+ boyanma görüldü. Nükleer derecesi 2 olan 3 (%7,5) olguda boyanma izlenmezken, 10 (%25) olguda 1+, 27 (%67,5) olguda 2+ boyanma saptandı. Nükleer derecesi 3 olan 5 (%31,2) olguda boyanma izlenmezken, 10 (%62,5) olguda 1+, 1 (%6,2) olguda 2+ boyanma saptandı. Nükleer derecesi 4 olan 8 (%80) olguda boyanma izlenmezken, 2 (%20) olgu 1+ boyanmaya sahipti. FoxO1 ekspresyon skoru ile Fuhrman nükleer derece arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı (Pearson Ki kare, $p<0,0001$) (Tablo 10). Bununla birlikte Spearman korelasyon testi ile iki parametre arasında negatif korelasyon saptandı ($p<0,0001$, $r=-0,638$).

pT evresi ile FoxO1 ekspresyon skoru incelendiğinde; pT1 olan 13 (%30,2) olgu 1+, 25 (%58,1) olgu 2+ iken, 5 (%11,6) olguda boyanma görülmedi. pT2 olan 5 (%45,4) olgu 1+, 4 (36,3) olgu 2+ iken, 2 (%18,1) olguda boyanma görülmedi. pT3 olan 6 (%37,5) olgu 1+, 1 (%6,2) olgu 2+ iken, 9 (%56,2) olguda boyanma

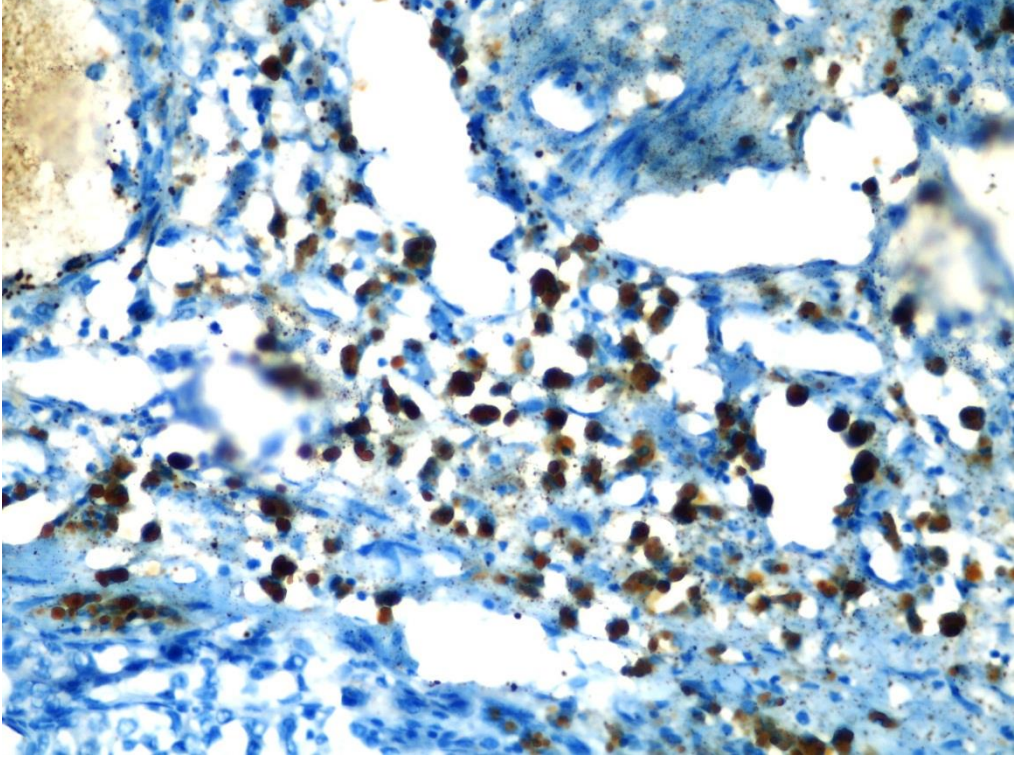
görülmedi. FoxO1 ekspresyon skoru ile pT evresi arasında anlamlı bir ilişki bulundu (Pearson Ki kare, $p=0,001$). Ayrıca iki parametre arasında negatif korelasyon saptandı (Spearman $p<0,0001$, $r=-0,475$).

Lenfovasküler invazyon ile FoxO1 ekspresyon skoru incelendiğinde; lenfovasküler invazyonun olduğu 1 (%12,5) olgu 2+ iken lenfovasküler invazyon olmayan olguların 29'unda (%46,7) 2+ boyanma izlendi. FoxO1 ekspresyon skoru ile lenfovasküler invazyon arasında anlamlı bir ilişki saptandı (Pearson Ki kare, $p=0,015$).

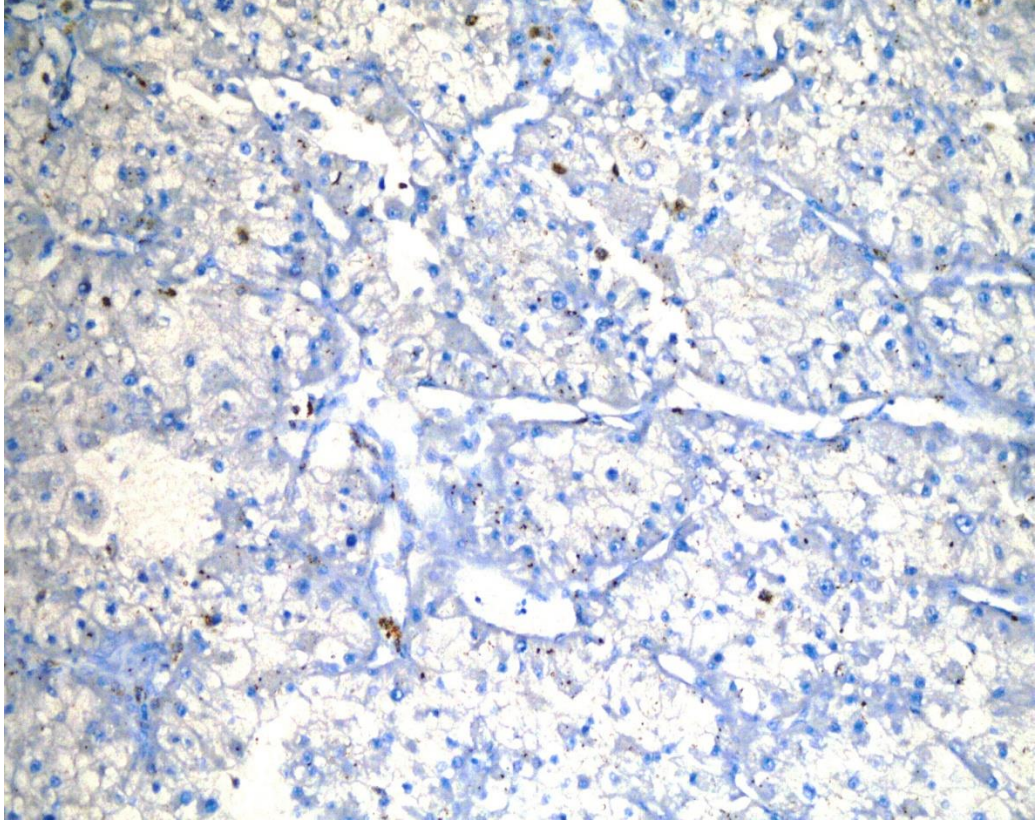
Tümör boyutu ile FoxO1 ekspresyon skoru incelendiğinde; 4 cm'den küçük tümörlerin 25'inde (%52,1) 2+ iken, 7 cm'den büyük tümörlerin hiçbiri 2+ değildir. FoxO1 ekspresyon skoru ile tümör boyutu arasında anlamlı bir ilişki vardır (Pearson Ki kare, $p=0,028$). FoxO1 ekspresyon skoru ile cinsiyet ve yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı (Pearson Ki kare, $p>0,05$) (Tablo 10).



Resim 4. Böbrek dokusunda proksimal tübüllerde yoğun nükleer FoxO1 pozitifliği (DAB x400).



Resim 5. FoxO1 ile nükleer derecesi 2 olan RHK'de yoğun nükleer boyanma (DAB x400).



Resim 6. FoxO1 ile nükleer derecesi 3 olan RHK'de tek tük zayıf nükleer boyanma (DAB x200).

Tablo 10. FoxO1 ekspresyon skoru ile klinikopatolojik parametrelerin ilişkisi

		FoxO1 ekspresyon skoru				p
		Toplam	(-) n (%)	1+ n (%)	2+ n (%)	
Cinsiyet	E	43	11 (25,5)	15 (34,8)	17 (39,5)	p=0,719
	K	27	5 (18,5)	9 (33,3)	13 (48,1)	
Yaş	<60	12	4 (33,3)	3 (25)	5 (41,6)	p=0,410
	≥60	58	12 (20,6)	21 (36,2)	25 (43,1)	
Fuhrman nükleer derece	Derece 1	4	0 (0)	2 (50)	2 (50)	p<0,0001
	Derece 2	40	3 (7,5)	10 (25)	27 (67,5)	
	Derece 3	16	5 (31,2)	10 (62,5)	1 (6,2)	
	Derece 4	10	8 (80)	2 (20)	0 (0)	
pT evresi	pT1	43	5 (11,6)	13 (30,2)	25 (58,1)	p=0,001
	pT2	11	2 (18,1)	5 (45,4)	4 (36,3)	
	pT3	16	9 (56,2)	6 (37,5)	1 (6,2)	
	pT4	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Lenfovasküler invazyon	Var	8	5 (62,5)	2 (25)	1 (12,5)	p=0,015
	Yok	62	11 (17,7)	22 (35,4)	29 (46,7)	
Tümör boyutu	≤4 cm	48	7(14,6)	16(33,3)	25(52,1)	p=0,028
	4-7 cm	18	6(33,3)	7(38,9)	5(27,8)	
	>7 cm	4	3(75)	1(25)	0	

4.2.3. p53 ekspresyonu

Nontümöral olguların hiçbirinde p53 ekspresyonu izlenmedi (Resim 7). Nükleer p53 ekspresyonu RHK'lerin 54'ünde (%77,2) saptandı (Resim 8-9). Tümöral ve nontümöral grupların p53 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (Fisher's Exact Test $p=0.014$) (Tablo 11).

Tablo 11. RHK ve nontümöral olgular arasında p53 ekspresyonu ilişkisi

	Toplam	p53 ekspresyonu		p
		(-) n (%)	(+) n(%)	
Nontümöral böbrek	10	10 (100)	0 (0)	p=0,014
RHK	70	16 (22,8)	54 (77,2)	

p53 ekspresyonu tümör hücrelerinde boyanma skoruna göre; 17 (%24,2) olgu 1+, 21 (%30) olgu 2+, 16 (%22,8) olgu 3+ ekspresyon gösterdi. Olguların 16 (%22,8)'sında boyanma izlenmedi. RHK'de p53 ekspresyon skoru ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki Tablo 12'de özetlenmiştir. p53 ekspresyon skoru ile Fuhrman nükleer derecesi karşılaştırıldığında nükleer derecesi 1 olan 2 (%50) olguda boyanma izlenmezken, 2 (%50) olguda ekspresyon skoru 1+'tır. Ekspresyon skoru 2+ ve 3+ olan olgu yoktur. Nükleer derecesi 2 olan 14 (%35) olguda boyanma izlenmezken, 14 (%35) olguda 1+, 11 (%27,5) olguda 2+, 1 (%2,5) olguda 3+ ekspresyon izlendi. Nükleer derecesi 3 olan 1 (%6,2) olguda 1+, 8 (%50) olguda 2+, 7 (%43,7) olguda 3+ ekspresyon izlendi. Nükleer derecesi 4 olan olguların 2'si (%20) 2+, 8'i (%80) 3+ ekspresyon gösterdi. p53 ekspresyon skoru ile nükleer derece arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı (Pearson Ki kare, $p<0,0001$) (Tablo 12). Ayrıca iki parametre arasında pozitif korelasyon saptandı (Spearman, $p<0,0001$, $r=0,770$).

pT evresi ile p53 ekspresyon skoru incelendiğinde; pT1 olan 15 (%34,8) olguda boyanma izlenmezken, 14 (%32,5) olgu 1+, 10 (%23,2) olgu 2+, 4 (%9,3) olgu 3+ ekspresyon gösterdi. pT2 olan 1 (%9) olguda boyanma izlenmezken, 2 (%18,1) olgu 1+, 6 (54,5) olgu 2+, 2 (%18,1) olgu 3+ ekspresyon gösterdi. pT3 olan 1 (%6,2) olgu 1+, 5 (%31,2) olgu 2+, 10 (%62,5) olgu 3+ ekspresyon gösterdi. p53

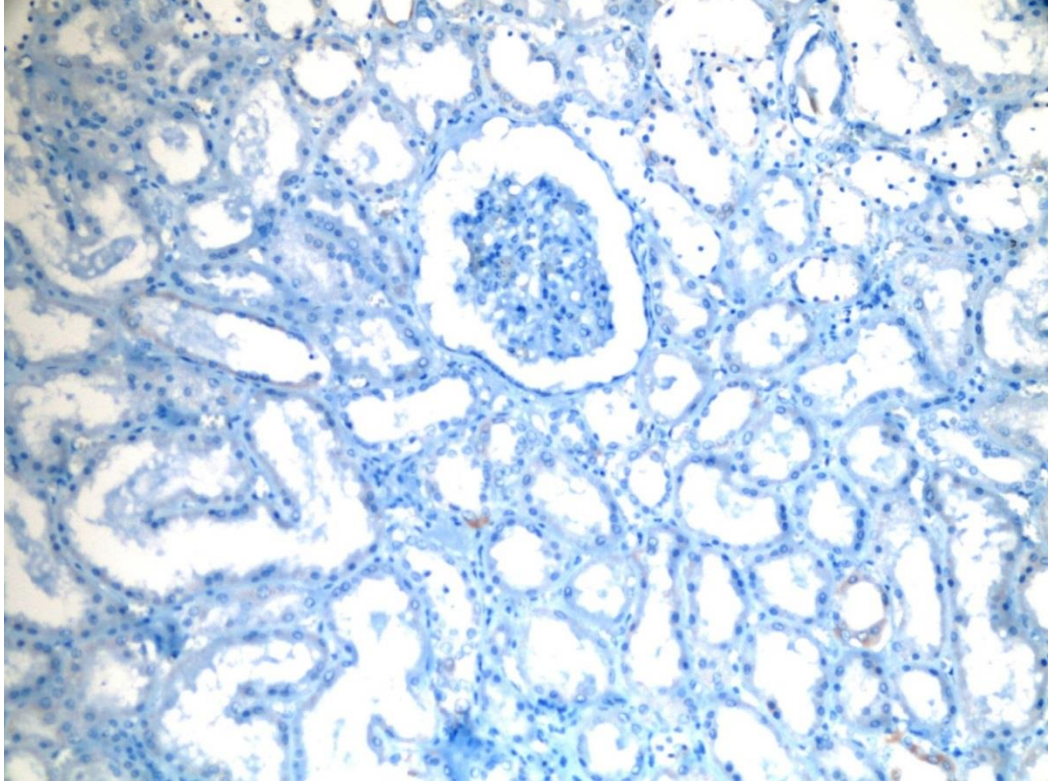
ekspresyon skoru ile pT evresi arasında anlamlı bir ilişki saptandı (Pearson Ki kare, $p < 0,0001$) . Ayrıca iki parametre arasında pozitif korelasyon saptandı (Spearman, $p < 0,0001$, $r = 0,600$).

Lenfovasküler invazyon ile p53 ekspresyon skoru incelendiğinde; lenfovasküler invazyonun olduğu 6 (%75) olguda, lenfovasküler invazyon olmayan 10 (%16,1) olguda 3+ ekspresyon saptandı. p53 ekspresyon skoru ile lenfovasküler invazyon arasında anlamlı bir ilişki vardır (Pearson Ki kare, $p = 0,003$).

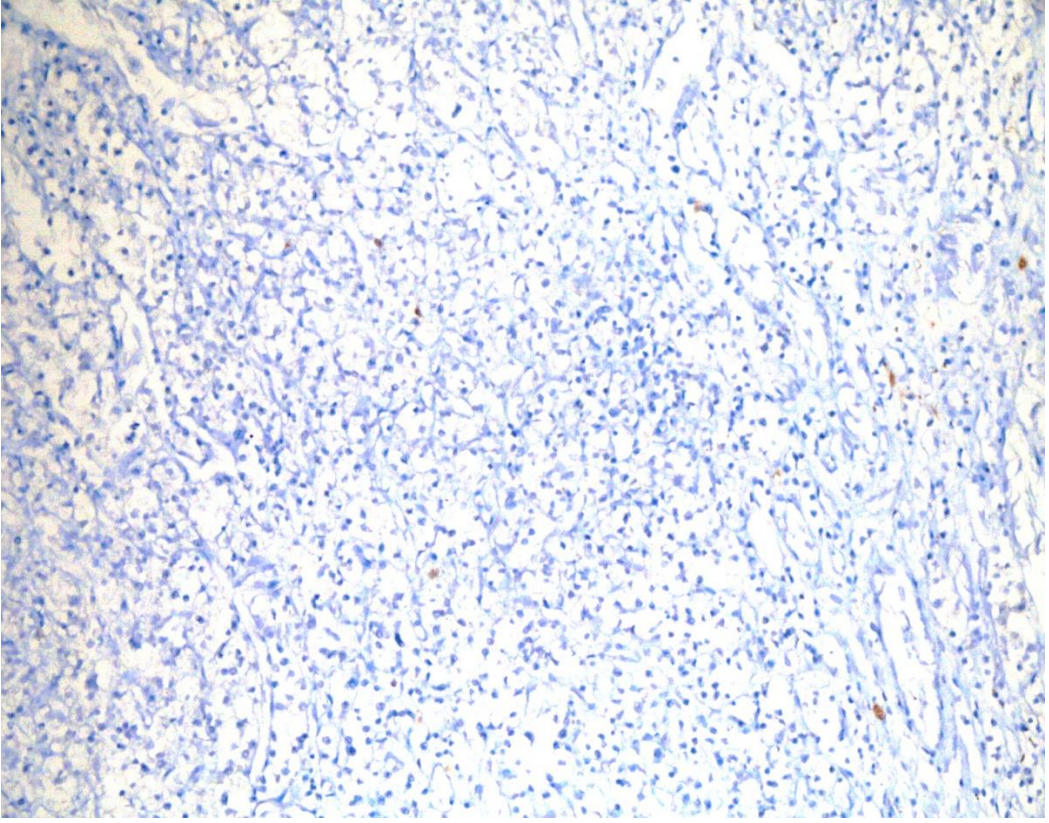
Tümör boyutu ile p53 ekspresyon skoru incelendiğinde; 4 cm'den küçük olguların 6'sında (%12,5) 3+ ekspresyon varken, 7 cm'den büyük olguların 3'ünde (%75) 3+ ekspresyon vardır. p53 ekspresyon skoru ile tümör boyutu arasında anlamlı bir ilişki saptandı (Pearson Ki kare, $p = 0,003$) . p53 ekspresyon skoru ile cinsiyet ve yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı (Pearson Ki kare, $p > 0,05$) (Tablo 12).

Tablo 12. p53 ekspresyonu ile klinikopatolojik parametrelerin ilişkisi

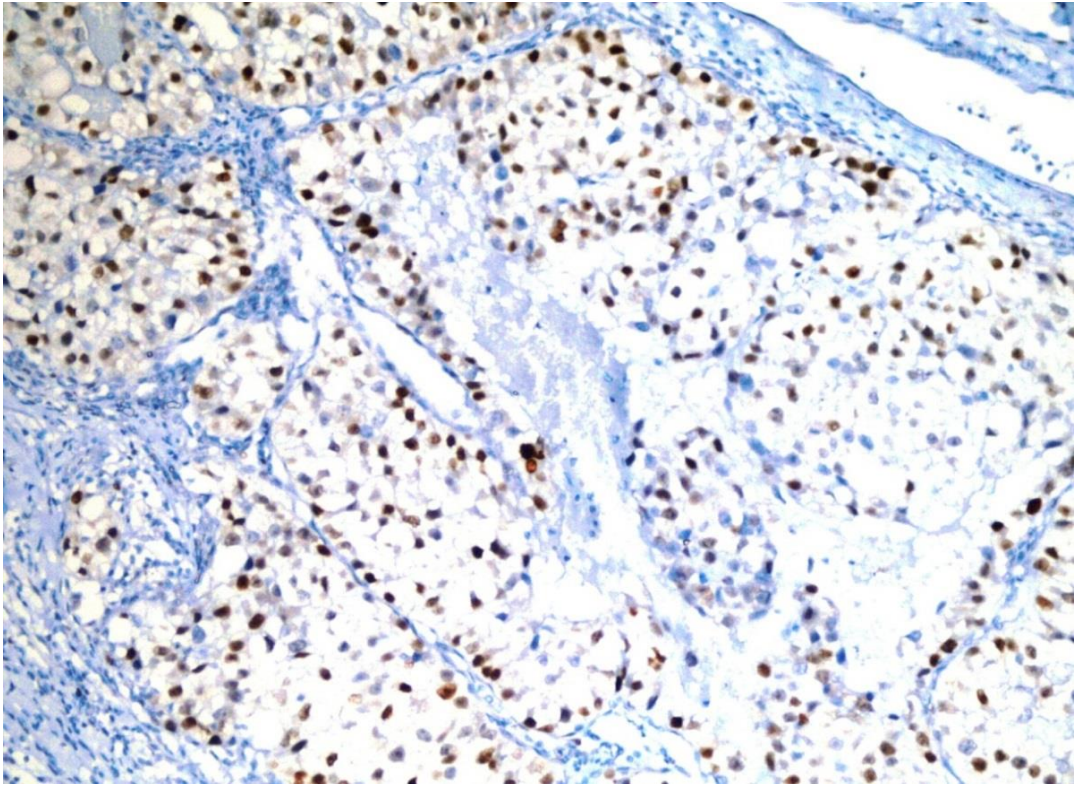
		p53 ekspresyon skoru					p
		Toplam	(-) n (%)	1+ n (%)	2+ n (%)	3+ n (%)	
Cinsiyet	E	43	8 (18,6)	10 (23,2)	13 (30,2)	12 (27,9)	p=0,537
	K	27	8 (29,6)	7 (25,9)	8 (29,6)	4 (14,8)	
Yaş	<60	12	2 (16,6)	5 (41,6)	2 (16,6)	3 (25)	p=0,276
	≥60	58	14 (24,1)	12 (20,6)	19 (32,7)	13 (22,4)	
Fuhrman nükleer derece	Derece 1	4	2 (50)	2 (50)	0 (0)	0 (0)	p<0,0001
	Derece 2	40	14 (35)	14 (35)	11 (27,5)	1 (2,5)	
	Derece 3	16	0 (0)	1 (6,2)	8 (50)	7 (43,7)	
	Derece 4	10	0 (0)	0 (0)	2 (20)	8(80)	
pT evresi	pT1	43	15 (34,8)	14 (32,5)	10 (23,2)	4 (9,3)	p<0,0001
	pT2	11	1 (9)	2 (18,1)	6 (54,5)	2 (18,1)	
	pT3	16	0 (0)	1 (6,2)	5 (31,2)	10 (62,5)	
	pT4	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0(0)	
Lenfovasküler invazyon	Var	8	0 (0)	1 (12,5)	1 (12,5)	6 (75)	p=0,003
	Yok	62	16 (25,8)	16 (25,8)	20 (32,3)	10 (16,1)	
Tümör boyutu	≤4 cm	48	15(31,3)	14(29,2)	13(27,1)	6(12,5)	p=0,003
	4-7 cm	18	1(5,6)	2(11,1)	8(44,4)	7(38,9)	
	>7 cm	4	0(0)	1(25)	0(0)	3(75)	



Resim 7. Normal böbrek dokusunda p53 negatifliği (DAB x200).



Resim 8. p53 ile nükleer derecesi 1 olan RHK'de seyrek nükleer pozitiflik (DAB x200).



Resim 9. p53 ile nükleer derecesi 3 olan RHK'de yoğun nükleer pozitiflik (DAB x200).

4.2.4. İmmünohistokimyasal Belirleyiciler Arasındaki İlişki

Anneksin 2 ve FoxO1 ekspresyonları arasındaki ilişki incelendiğinde; Anneksin 2 ekspresyonu olmayan olguların tamamının FoxO1 ile ekspresyon gösterdiği saptandı. Anneksin 2 ekspresyonu olan 16 (%23,5) olgu FoxO1 ile negatif iken, 52 (%76,4) olgu pozitif olarak saptandı. Bu bulgulara göre Anneksin 2 ekspresyonu ile FoxO1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (Fisher's Exact Test, $p=0,593$) (Tablo 13).

Tablo 13. RHK'de Anneksin 2 ve FoxO1 ekspresyonları arasındaki ilişki

		FoxO1 ekspresyonu		p
		(-) n (%)	(+) n (%)	
Anneksin 2 ekspresyonu	(-)	0 (0)	2 (100)	p=0,593
	(+)	16 (23,5)	52 (76,4)	

Anneksin 2 ve FoxO1 ekspresyon skorları arasındaki ilişki incelendiğinde; Anneksin 2 ile negatiflik gösteren 1 (%50) olgu FoxO1 ile 1+, 1 (%50) olgu 2+ ekspresyon gösterirken; Anneksin 2 ile 2+ ekspresyon gösteren 11 (%52,3) olgu FoxO1 ile negatif, 10 (%47,6) olgu FoxO1 ile 1+ ekspresyon gösterdi. Anneksin 2 ve FoxO1 ekspresyon skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı (Pearson Ki kare, $p<0,0001$) (Tablo 14). Ayrıca ekspresyon skorları arasında negatif korelasyon saptandı (Spearman, $p<0,0001$, $r=-0,587$).

Tablo 14. RHK'de Anneksin 2 ve FoxO1 ekspresyon skorları arasındaki ilişki

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

FoxO1 ekspresyonu ile p53 ekspresyonu ilişkisi incelendiğinde; FoxO1 ekspresyonu olmayan 2 (%12,5) olgu p53 ile negatif, 14 (%87,5) olgu p53 ile pozitifdir. FoxO1 ekspresyonu olan 29 (%53,7) olgu p53 ile negatif, 25 (%46,2) olgu ise pozitif saptandı. Bu bulgulara göre FoxO1 ekspresyonu ile p53 ekspresyonu

arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı (Fisher's Exact Test, $p=0,004$) (Tablo 15).

Tablo 15. RHK'de FoxO1 ve p53 ekspresyonları arasındaki ilişki

		p53 ekspresyonu		p
		(-) n (%)	(+) n (%)	
FoxO1 Ekspresyonu	(-)	2 (12,5)	14 (87,5)	p=0,004
	(+)	29 (53,7)	25 (46,2)	

FoxO1 ve p53 ekspresyon skorları arasındaki ilişki incelendiğinde; 14 (%87,5) olgu p53 ile 3+ ekspresyon gösterirken FoxO1 ile negatifti. FoxO1 ile 2+ ekspresyon gösteren 12 (%40) olgu ise p53 ile negatifti. FoxO1 ve p53 ekspresyon skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı (Pearson Ki kare, $p<0,0001$) (Tablo 16). Ayrıca ekspresyon skorları arasında negatif korelasyon saptandı (Spearman, $p<0,0001$, $r=-0,690$).

Tablo 16. RHK'de FoxO1 ve p53 ekspresyon skorları arasındaki ilişki

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

Anneksin 2 ve p53 ekspresyonları arasındaki ilişki incelendiğinde; Anneksin 2 ekspresyonu olmayan 1 (%50) olgu p53 negatif, 1 (%50) olgu p53 pozitifdir. Anneksin 2 ekspresyonu olan 30 (%44,1) olgu p53 negatif, 38 (%55,8) olgu p53 pozitif saptandı. Bu bulgulara göre Anneksin 2 ve p53 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (Fisher's Exact Test, $p=0,693$) (Tablo 17).

Tablo 17. RHK’de Anneksin 2 ve p53 ekspresyonları arasındaki ilişki

		p53 ekspresyonu		p
		(-) n (%)	(+) n (%)	
Anneksin 2 ekspresyonu	(-)	1 (50)	1 (50)	p=0,693
	(+)	30 (44,1)	38 (55,8)	

Anneksin 2 ve p53 ekspresyon skorları arasındaki ilişki incelendiğinde; Anneksin 2 ile negatiflik gösteren 1 (%50) olgu p53 1+, 1 (%50) olgu p53 2+ ekspresyon göstermektedir. Anneksin 2 ile 2+ ekspresyon gösteren 1 (%4,7) olgu p53 ile negatif, 1 (%4,7) olgu 1+, 7 (%33,3) olgu 2+, 12 (%57,1) olgu 3+ ekspresyon gösterdi. Anneksin 2 ve p53 ekspresyon skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı (Pearson Ki kare, $p<0,0001$) (Tablo 18). Bununla birlikte ekspresyon skorları arasında pozitif korelasyon saptandı (Spearman $p<0,0001$, $r=0,522$).

Tablo 18. RHK’de Anneksin 2 ve p53 ekspresyon skorları arasındaki ilişki

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

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Böbrek kanserleri tüm kanserlerin %2'sini oluşturmaktadır (1). RHK, her iki cinste de böbrek kaynaklı malignitelerin %90'ını oluşturur (4). Tüm erişkin maligniteleri arasında erkeklerde 12., kadınlarda 17. sıradadır. E/K oranı 1.5/1'dir (5). RHK, sıklıkla 40 yaşından sonra görülmektedir. 60-70 yaş arasında görülme sıklığı en üst düzeye ulaşmaktadır (7). Bizim çalışmamızda ortalama yaş $62,8 \pm 12,4$ (34-86) olup, erkek olguların sayısı daha fazlaydı.

Tümör evresi RHK'li hastalarda prognozun en önemli belirleyicisi olarak kabul edilmektedir (54). RHK'de tümör evresi arttıkça prognozun kötüleştiği saptanmıştır (110). Lang ve arkadaşlarının (58) yapmış olduğu çalışmada; evre 1 tümörlerde 5 yıllık sağkalım %90-100, evre 2'de %75-90, evre 3'de %60-70 ve evre 4'de %15-30 olarak bildirilmiştir. Günümüzde en sık AJCC 2002 TNM evreleme sistemi kullanılmaktadır. Bu sistemde evre 1 ve evre 2 tümörler arasında ana ayırıcı kriter tümör boyutudur (49). RHK'de Fuhrman nükleer derecesinin önemli bir diğer prognostik faktör olduğu gösterilmiştir (111). Çalışmamızda pT evresi yüksek tümörlerde nükleer derecenin de yüksek olduğu saptandı.

RHK'lerde tümör boyutu birkaç mm ile 15-20 cm arasında değişebilmektedir (112). Olgularımızda da en küçük tümör boyutu 1,9 cm, en büyük tümör boyutu ise 13,8 cm olup, ortalama tümör boyutu 5,9 cm'dir. Bununla birlikte, çalışmamızda nükleer derecesi yüksek olan tümörlerin büyük boyutlu tümörler olduğu saptandı.

Yapılan çalışmalarda pT evresi, tümör boyutu, nükleer derece ve tümör alttıplerinin prognozla ilişkili olduğu saptanmıştır. Bunlara ek olarak perirenal yağ dokusu invazyonunun kötü prognoz etkeni olduğu tespit edilmiştir (8, 9, 11, 12, 41). Çalışmamızda RHK'lerde prognozu etkileyen diğer parametreler olan lenfovasküler invazyon, perirenal yağ dokusu invazyonu ve renal sinüs invazyonu ile Fuhrman nükleer derecesi arasında ilişki saptandı.

RHK'de evre ve derecelendirme prognozu önemli ölçüde belirlemekle beraber, sağkalım için daha objektif parametrelere ihtiyaç vardır. Bu nedenle günümüze kadar çok sayıda potansiyel belirleyiciler araştırılmıştır. Bu belirleyicilerden biri olan Anneksin, hücre bölünmesi, apoptoz, büyüme regülasyonu

ve düz kaslardaki kalsiyum fonksiyonları ile ilişkili bir proteindir (25). Hücre içerisinde hücre bölünmesi, apoptoz, veziküllerin taşınması, kalsiyum sinyalizasyonu ve büyüme regülasyonu gibi pekçok hücrel fonksiyonları vardır. Fibrinoliz ve pıhtılaşma ile bağlantılı oldukları, inflamasyonda da görev aldıkları tespit edilmiştir (26,82).

Duncan ve arkadaşları (31) yapmış oldukları çalışmada kolorektal kanserlerde normal kolona göre Anneksin 2 ekspresyonunun arttığını kanıtlamışlardır. Esposito ve arkadaşları (86) ise PCR (Polimeraze Chain Reaction) ve immünohistokimyasal yöntemle PanIN'den (Pankreas Intraepitelyal Neoplazi) karsinoma gidişte pankreas kanserinde Anneksin 2 ekspresyonunda artış olduğunu göstermişlerdir. Syed ve arkadaşları (88) benign ve malign vasküler tümörlerde Anneksin 2'in yaygın ve kuvvetli boyandığını tespit etmişlerdir. Buna karşılık, Yee ve arkadaşları (89) benign prostat dokularının %85'inden fazlasında Anneksin 2 ile boyanma saptarken prostat adenokarsinom olgularının çoğunda ekspresyonda azalma bildirmiştir. Literatürde RHK'de Anneksin 2 ekspresyonunu araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda RHK'de nontümöral böbrek dokusuna oranla daha yüksek Anneksin 2 ekspresyonu olduğu bildirilmiştir (87, 113). Literatür bilgileriyle uyumlu şekilde çalışmamızda da tümöral olgularda normal böbrek dokularına kıyasla daha yüksek oranda Anneksin 2 ekspresyonu bulundu.

Meme kanserlerinde yapılan bir çalışmada Anneksin 2 ekspresyonundaki artışın anjiogenez ve metastazların artışı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (30). Emoto ve arkadaşlarının (85) çalışmasında mide kanserinde histolojik derece, tümör boyutu, evresi ve invazyon derinliğinin artması ile Anneksin 2 ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Zimmermann ve arkadaşları (87) 33 RHK berrak hücreli tip olgusunda Anneksin 2 ekspresyonunu immünohistokimya, PCR ve Western Blot yöntemleri ile araştırmışlardır. Bu çalışmada nükleer derecesi yüksek olan RHK'lerde Anneksin 2 ekspresyonunun arttığı ve bu artışın prognozu olumsuz etkilediği tespit edilmiştir (87). Ohno ve arkadaşları (113) Anneksin 2 ekspresyonunun primer RHK'de %47,7 ve metastatik RHK'de %87,5 oranında olduğunu belirtmişlerdir. Primer tümörlerde Anneksin 2 ekspresyonundaki artışın daha yüksek evre ve nükleer derece ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, metastaz olmayan olgularda Anneksin 2 ekspresyonunun artması ile 5 yıllık sağ kalımın azaldığını bildirmişlerdir. Bununla

birlikte, Anneksin 2 ekspresyonundaki artışın metastaz için bağımsız bir risk faktörü olduğunu tespit etmişlerdir (113).

Bizim çalışmamızda Anneksin 2 ile tümörlerin %97,1'inde, normal böbrek dokularının %30'unda pozitiflik saptandı. Zimmerman ve Ohno'nun çalışmaları ile (87, 113) uyumlu olarak çalışmamızda nükleer derecesi ve pT evresi yüksek olan olguların Anneksin 2 ile anlamlı olarak daha yüksek oranda şiddetli ekspresyon gösterdiklerini saptadık. Bu bulgulara ek olarak, lenfovasküler invazyon gösteren olgularda da ekspresyon oranında artış saptandı.

FoxO1 proteini, hücre proliferasyonu, hücre döngüsü progresyonu, diferansiyasyon, metabolizma, DNA hasar tamiri ve apoptoz mekanizmalarında görev alan ve bir transkripsiyon faktörü olan Fox (Forkhead box-containing protein, O-subfamily) ailesinin bir üyesidir (16, 17). Ekspresyonundaki azalmanın hücre döngüsünün kontrolünün ve apoptozun bozulmasına, dolayısı ile tümör oluşumuna sebep olduğu düşünülmektedir (31). Myatt ve arkadaşları (18) yapmış oldukları çalışmada, PCR ve Northern blot yöntemi ile normal endometriyum ve endometriyal kanserlerdeki FoxO1 ekspresyonlarını karşılaştırmışlardır. Malign olgularda FoxO1'in downregüle olduğunu tespit etmişler ve bunun onkogenin bir parçası olduğunu savunmuşlardır (18). Goto ve arkadaşları (19) da immünohistokimyasal yöntemle endometriyal adenokarsinomlarda normal endometriyuma göre FoxO1 ekspresyonunda azalma saptamışlardır (19). Diğer bir çalışmada meme tümörlerinde normal meme dokusuna göre FoxO1 ekspresyonunda azalma olduğu ve FoxO1 ekspresyonunun artması ile hücre yaşam süresinin azaldığı ileri sürülmüştür (20). Dong ve arkadaşları (21) prostat adenokarsinomlarında normal prostat dokusuna göre FoxO1'in regülasyonunun azaldığını ve bu nedenle FoxO1'in prostat için tümör baskılayıcı özelliklere sahip olduğunu öne sürmüşlerdir. Literatürde RHK'de FoxO1 ekspresyonunu araştıran az sayıda çalışmalardan birinde fare ve insan RHK olgularında FoxO'ların renal tümör oluşumunda negatif feedback özelliklerine sahip olduğu ve FoxO sinyalinin renal kanser gelişimini engellediği belirtilmektedir (22). Zhou ve arkadaşlarının (24) çalışmasında nontümöral böbrekte %100, berrak hücreli RHK'lerde %62,9 oranında FoxO1 ekspresyonu olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda nontümöral olguların %90'ında, tümöral olguların ise %77,2'sinde FoxO1 ekspresyonu izlendi. Tümörde ekspresyon oranında azalma izlenmekle birlikte iki

grup arasında FoxO1 ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

Gan ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada RHK histolojik alttiplerinde FoxO1 ekspresyonunda farklılıklar olduğu saptanmıştır. Bu çalışmaya göre kromofob tip RHK ve benign tümörlere göre berrak hücreli ve papiller gibi agresif RHK alt tiplerinde FoxO1 ekspresyonunda anlamlı azalma olduğu bulunmuştur (22). Bu sonuçlara bağlı olarak FoxO1'in RHK'lerin histolojik alttiplerinin tanısında ve prognozu öngörmede kullanılabileceği iddia edilmiştir (22). Kojima ve arkadaşları (23) FoxO1 ekspresyonunda azalmanın, berrak hücreli RHK'lerde artmış metastaz ve kötü prognoz ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Diğer bir çalışmada, berrak hücreli RHK'lerde yüksek pT evresi ve nükleer derecesi olan tümörlerde FoxO1 ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur. (24). Literatürde az sayıda bulunan çalışma ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda da nükleer derecesi ve pT evresi yüksek olan olguların FoxO1 ile daha zayıf ekspresyon gösterdiklerini saptadık. Bu bulgulara ek olarak, lenfovasküler invazyon gösteren olgularda da ekspresyon oranında azalma saptandı. Olgularımızın tamamının berrak hücreli tip olması nedeniyle FoxO1 ekspresyonu ve RHK'nin histolojik alttipleri arasındaki ilişki hakkında yorum yapılamadı.

p53 geni tümör baskılayıcı gendir. İnsan tümörlerinin en az %50'si bu genin mutasyonlarını içerir. p53 geninin homozigot mutasyonu akciğer, meme ve kolon kanserleri başta olmak üzere birçok kanserin gelişimine ve kötü prognoza neden olur (6). Berrak hücreli RHK'lerde p53 aşırı ekspresyonunun prognozu olumsuz etkilediği belirtilmektedir (118). Girgin ve arkadaşları (14) 50 RHK olgusunda p53 ekspresyonunu pT evresi, nükleer derece, histolojik alttip, tümör boyutu ile karşılaştırıp, prognoz ile ilişkisini değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında pT evresi, nükleer derece ve p53 ekspresyonunun önemli prognostik faktörler olduğunu tespit etmişlerdir. Shvarts ve arkadaşları (15) 350 RHK olgusunda immünohistokimyasal yöntemle p53 ekspresyonunu araştırmışlar ve nefrektomi olmayan hastalarda p53 boyanması %20'nin üzerinde olanlarda tümör rekürrensının daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda RHK'lerde normal böbrek dokusuna oranla daha yüksek oranda p53 ekspresyonu saptanmıştır. Bu çalışmalarda p53 ekspresyon oranları %49-86 arasında bulunmuştur (114-116). Çalışmamızda nontümöral

olguların hiçbirinde p53 ekspresyonu izlenmezken RHK'lerin %77,2'sinde nükleer p53 ekspresyonu saptandı. Literatür bulguları ile uyumlu olarak RHK'lerde daha yüksek oranda p53 ekspresyonu saptadık.

Noon ve arkadaşları (114) yapmış oldukları çalışmada p53 ekspresyonu gösteren RHK olgularında pT evresi ve nükleer derecenin daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Cho ve arkadaşları (115) da p53 pozitifliği ile prognostik parametreler arasında benzer sonuçlar bulmuştur. Diğer çalışmalarla uyumlu olarak çalışmamızda da nükleer derecesi ve pT evresi yüksek olan tümörlü olguların p53 ile daha yüksek oranda şiddetli ekspresyon gösterdiklerini saptadık. Bu bulgulara ek olarak, lenfovasküler invazyon gösteren olgularda da ekspresyon oranında artış saptandı.

Sonuç olarak çalışmamızda Anneksin 2 ve FoxO1'in normal böbrek dokusunda ve berrak hücreli RHK'lerde eksprese olduğunu saptadık. Anneksin 2 ekspresyonunun RHK'lerde normal böbrek dokularına oranla daha yüksek olması, bu proteinin RHK'nin gelişiminde ve progresyonunda rol oynadığını düşündürmektedir. Bununla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamakla birlikte normal böbrek dokusuna oranla tümörde FoxO1 ekspresyonunda azalma izlenmesi ise FoxO1'in tümör baskılayıcı olduğunu destekler niteliktedir. Bu bulgulara ek olarak nükleer derecesi ve pT evresi yüksek olan olguların Anneksin 2 ile daha güçlü, buna karşın FoxO1 ile daha zayıf ekspresyon gösterdiklerini saptadık. Literatürde bu iki belirteci beraber inceleyen çalışma yoktur. Aynı zamanda her iki belirleyici arasında negatif korelasyon olduğunu bulduk. Bu veriler ışığında Anneksin 2 ve FoxO1'in RHK'nin diferansiyasyonunda ve agresif davranışında da rol oynayabileceğini düşünmekteyiz.

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

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

ÖZET

Renal Hücreli Karsinomlarda FoxO1, Anneksin 2 ve p53 Ekspresyonunun Klinikopatolojik Parametreler ile İlişkisinin İmmünohistokimyasal Yöntemle Araştırılması

Amaç: Bu çalışmanın amacı, FoxO1, Anneksin 2 ve p53'ün immünohistokimyasal ekspresyonlarının klinikopatolojik parametrelerle ilişkisini araştırıp, renal hücreli karsinom (RHK) gelişimindeki rollerini belirlemektir.

Yöntem: On normal böbrek ve 70 berrak hücreli RHK (BHRHK)'de immünohistokimyasal yöntemle FoxO1, Anneksin 2 ve p53 ekspresyonları incelendi. FoxO1, Anneksin 2 ve p53 ekspresyonları ve klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki yanı sıra bu belirleyiciler arasındaki korelasyon değerlendirildi.

Bulgular: Anneksin 2 ve p53 ekspresyonları BHRHK olgularında normal böbrek dokularına göre anlamlı olarak artmıştı ($p < 0,0001$, $p = 0,014$, sırasıyla). Normal böbrek dokuları ile BHRHK arasında FoxO1 ekspresyonu açısından anlamlı bir fark yoktu ($p > 0,05$). Anneksin 2 ve p53 ekspresyonları yüksek nükleer dereceli ($p = 0,001$, $p < 0,0001$, sırasıyla) ve yüksek pT evreli ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$, sırasıyla) olgularda daha güçlüydü. Bu belirteçler ile lenfovasküler invazyon ve tümör boyutu arasında da anlamlı ilişki bulduk ($p < 0,05$). FoxO1 ekspresyonu düşük nükleer dereceli ($p < 0,0001$) ve düşük pT evreli ($p = 0,001$) olgularda daha güçlüydü. FoxO1 ekspresyonu ile lenfovasküler invazyon ve tümör boyutu arasında da anlamlı bir ilişki bulduk ($p < 0,05$). Ek olarak, BHRHK olgularında, Anneksin 2 ve p53 ekspresyonları ($p < 0,0001$, $r = 0,522$) arasında pozitif korelasyon, Anneksin 2 ve FoxO1 ekspresyonları ($p < 0,0001$, $r = -0,587$) yanısıra FoxO1 ve p53 ekspresyonları ($p < 0,0001$, $r = -0,690$) arasında da negatif korelasyon bulundu.

Sonuç: Bulgularımız FoxO1, Anneksin 2 ve p53 ekspresyonlarının BHRHK'lerin diferansiyasyonu, progresyonu ve agresif davranışında rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, bulgularımızı doğrulamak ve bu belirteçlerin BHRHK gelişimindeki rolünü belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

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

ABSTRACT**The Investigation of The Relationship Between FoxO1, Annexin 2 and p53 Expressions and Clinicopathological Parameters in Renal Cell Carcinoma with Immunohistochemistry**

Aim: The aim of the present study was to investigate the immunohistochemical expressions of FoxO1, Annexin 2 and p53 in association with the clinicopathological parameters in order to define their roles in the development of renal cell carcinoma (RCC).

Method: Immunohistochemical analyse of FoxO1, Annexin 2 and p53 expressions were performed on the sections of 10 normal kidney and 70 clear cell RCC (cRCC) tissues. The association between FoxO1, Annexin 2 and p53 expressions and the clinicopathological parameters as well as, the correlation between these markers were analysed.

Results: The expressions of Annexin 2 and p53 were significantly higher in cRCC than the normal kidney tissues ($p < 0,0001$, $p = 0,014$, respectively). There was not any significant difference between cRCC and normal kidney groups regarding the expression of FoxO1 ($p > 0,05$). Annexin 2 and p53 expressions were significantly stronger in cases with higher nuclear grade ($p = 0,001$, $p < 0,0001$ respectively) and pT stage ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ respectively). We also found significant association between these markers and lymphovascular invasion and tumor size ($p < 0,05$). FoxO1 expression was significantly stronger in cases with lower nuclear grade ($p < 0,0001$) and pT stage ($p = 0,001$). There was a significant association between FoxO1 expression and lymphovascular invasion and tumor size ($p < 0,05$). In addition, a positive correlation was found between Annexin 2 and p53 expressions ($p < 0,0001$, $r = 0,522$), furthermore a negative correlation was found between Annexin 2 and FoxO1 ($p < 0,0001$, $r = -0,587$), as well as FoxO1 and p53 expressions ($p < 0,0001$, $r = -0,690$) in cRCC cases.

Conclusion: According to our results we suggest that FoxO1, Annexin 2 and p53 expressions may involve in differentiation, progression, and the aggressiveness of cRCC. However, further studies are needed to approve our findings and to clarify the role of these markers in the development of cRCC.

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

KAYNAKLAR

1. Eble JN, Sauter G, et al: WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, Lyon, France, IARC Press, 2004.
2. Tuncer AM. Türkiye’de Kanser Kontrolü. *T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı*, 2009; Yayın No:777.
3. Dal CP, Gaeta J, Huben R, Li FP, et al. Renal cortical tumors. Cytogenetic characterization. *Am J Clin Pathol.* 1989; 92:408-414.
4. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. Globocan Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. *Int. J. Cancer:* 2010; 127:2893–2917.
5. D. Max Parkin, MD, Freddie Bray, J. Ferlay and Paola Pisani, PhD Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(2):74-108
6. Ordonez NG, Rosai J. Urinary tract. Ackerman’s Surgical Pathology’de Ed. Rosai J. Eight Edition. New York, Mosby 1996; 1145-1153.
7. Kovacs G. Molecular differential pathology of renal cell tumors. *Histopathology* 1993; 22:1-8.
8. Murphy WM. Diseases of the kidney. Urological Pathology. Philadelphia: W.B. Saunders Co. 1989; 409-482.
9. Kirkali Z, Lekili M. Renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol.* 2003; 13:433-438.
10. Giberti C, Oneto F, Martorana G, Rovida S, et al. Radical nephrectomy for renal cell carcinoma: long-term results and prognostic factors on a series of 328 cases. *Eur Urol.* 1997; 31:40-48. 35
11. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1982; 6:655-663.
12. Ribeiro Silva A, Ramalho LN, Garcia SB, Zucoloto S. The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. *Arch Pathol Lab Med.* 2003; 127:336-340.
13. Zhang L, Yu D, Hu M, Xiong S, et al. Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer. Res.* 2000; 60:3655-3661.
14. Girgin C, Tarhan H, Hekimgil M, Sezer A, Gürel G. p53 mutations and other prognostic factors of renal cell carcinoma. *Urol Int.* 2001; 66:78–83.
15. Shvarts O, Seligson D, Lam J, Shi T, et al. p53 is an independent predictor of tumor recurrence and progression after nephrectomy in patients with localized renal cell carcinoma. *The Journal of Urology.* 2005; 173: 725-728.
16. Rena G, Guo S, Cichy SC, Unterman TG, Cohen P. Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J. Biol. Chem.* 1999; 274 (24): 17179–83
17. Nakae J, Kitamura T, Silver DL, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J. Clin. Invest.* 2001; 108 (9): 1359–67.

18. Myatt SS, Wang J, Monteiro LJ, et al. Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer. *Cancer Res* 2010; 70:367–377.
19. Goto T, Takano M, Albergaria A, et al.: Mechanism and functional consequences of loss of FOXO1 expression in endometrioid endometrial cancer cells. *Oncogene* 2008; 27:9–19.
20. Guttilla IK, White BA. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2009; 284:23204–23216.
21. Dong XY, Chen C, Sun X, et al. FOXO1A is a candidate for the 13q14 tumor suppressor gene inhibiting androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer Res* 2006; 66:6998–7006.
22. Gan B, Lim C, Chu G, et al. FoxOs enforce a progression checkpoint to constrain mTORC1-activated renal tumorigenesis. *Cancer Cell* 2010; 18:472–484.
23. Kojima T, Shimazui T, Horie R, et al. FOXO1 and TCF7L2 genes involved in metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2010; 49: 379–389.
24. Zhou L1, Yin B, Liu Y, Hong Y, Zhang C, Fan J. Mechanism and Function of Decreased FOXO1 in Renal Cell Carcinoma. *Journal of Surgical Oncology* 2012; 105:841–847.
25. Geisow M J, Walker J H, Boustead C, Taylor W. "Annexins – a new family of Ca²⁺ - regulated phospholipid-binding protein". *Biosci Rep.* 1987; (4): 289–98.
26. Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.*2005; 6(6):449–61.
27. Wang KL, Wu TT, Resetkova E, Wang H, Correa AM, Hofstetter WL, et al. Expression of annexin A1 in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome. *Clin Cancer Res* 2006; 12:4598–4604.
28. Wu CM, Lee YS, Wang TH, Lee LY, Kong WH, Chen ES, et al. Identification of differential gene expression between intestinal and diffuse gastric cancer using cDNA microarray. *Oncol Rep* 2006; 15:57–64.
29. Shen D, Nooraie F, Elshimali Y, Lonsberry V, He J, Bose S, et al. Decreased expression of annexin A1 is correlated with breast cancer development and progression as determined by a tissue microarray analysis. *Hum Pathol* 2006; 37:1583–1591.
30. Sharma MR, Koltowski L, Ownbey RT, Tuszyński GP, Sharma MC. Angiogenesis-associated protein annexin II in breast cancer: selective expression in invasive breast cancer and contribution to tumor invasion and progression. *Exp Mol Pathol* 2006; 81:146–156.
31. Duncan R, Carpenter B, Main LC, Telfer CT, Murray GI. Characterisation and protein expression profiling of annexins in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2008; 98:426–433.
32. Reeves SA, Chavez-Kappel C, Davis R, Rosenblum M, Israel MA. Developmental regulation of annexin II (lipocortin 2) in human brain and expression in high grade glioma. *Cancer Res* 1992; 52:6871–6876.
33. Genge BR, Wu LN, Wuthier RE. Differential fractionation of matrix vesicle proteins. Further characterization of the acidic phospholipid-dependent Ca²⁺-binding proteins. *J Biol Chem.*1990; 265(8):4703–10.

34. Sternberg S. Histology for Pathologists. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1997;799-845.
35. Williams LP. Abdominal urinary organs. Gray's anatomy. 38th edition. London: 1995;1815-27.
36. Clapp WL, Croker BP. Kidney. Mills ES. Histology For Pathologists. 3th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2007.839-908.
37. Guyton AC. The kidneys and body fluids. Textbook of Medical Physiology. WB Saunders Company, Philadelphia;1991: 273–353.
38. Murphy WM, Beckwith JC, Farrow GM. Normal Anatomy. In: Rosai J, Sobin L Heditor. Tumors of the kidney, bladder and related urinary structures. AFIP. 1994; 1-11
39. The Urinary System. In: Junqueira LC and Carneiro J. Basic histology. 10th ed. New York: McGraw-Hill Companies. 2003;382-402.
40. Guyton AC. The kidneys and body fluids. In: Guyton AC (eds). Textbook of Medical Physiology. WB Saunders Company, Philadelphia 1991;273–353.
41. Pantuck AJ, Zeng G, Beldegrun AS, Figlin RA. Pathobiology, prognosis and targeted therapy for renal cell carcinoma: Exploiting the hypoxia-induced pathway. *Clin Cancer Res.* 2003;9:4641- 4652.
42. Levine E. Renal cell carcinoma in uremic acquired renal cystic disease: incidence, detection, and management. *Urol Radiol* 1992;13(4):203-10.
43. Adami J, Gäbel H, Lindelöf B, Ekström K, Rydh B, Glimelius B et al. Cancer risk following organ transplantation: a nationwide cohort study in Sweden. *Br J Cancer* 2003;89:1221-7.
44. Parker As, Cerhan JR, Lynch CF. History of urinary tract infection and risk of renal celi carcinoma. *Am J Epidemiol.* 2004;159:42-8.
45. Bukowski RM, Bro WP. Underlying pathophysiology of renal cell carcinoma: an essential premier on etiology, tumor cell growth and therapeutic targets. *Kidney Cancer J.* 2004;10-15.
46. Murai M, Oya M. Renal cell carcinoma: etiology, incidence and Epidemiology. *Current Opinion in Urology.*2004;14:229- 233.
47. Van Den Berg E, Van Der Hout AH, Osterhüs JW. Cytogenetic analysis of epithelial renal cell tumors relationship with a new histopathological classification. *Int. J. Cancer.* 1993;223-227.
48. Kovacs G, Frisch S: Clonal chromosome abnormalities in tumor cells from patients with sporadic renal cell carcinomas. *Cancer Res.* 1989;49:651-659
49. Storkel S, Ebie JN, Adlakha K, et al. Classification of renal cell carcinoma: Workgroupno.1 Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 1997;80:987-989.
50. Kim HL, Beldegrun AS, Freitas DG, Bui MH, Han KR, Dorey FJ et al. Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implications for prognosis. *J Urol Nov.* 2003;170(5):1742-6.
51. Steffens J, Bock R, Braedell HU, Renin producing renal cell carcinomas –clinical and experimental investigations on a special form of renal hypertension. *Urol Res.*1992; 20: 111.

52. Kontak JA, Campbell SC. Prognostic factors in renal cell carcinoma. *Urol Clinics North Am.* 2003; 30:467-480.
53. Flocks RH, Kadesky MC. Malignant neoplasms of the kidney: an analysis of 353 patients followed 5 years or more. *J Urol.*1958; 79:196-201.
54. Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol.* 1969; 101:297-301.
55. Harmer M. TNM Classification of Malignant Tumors. 2nd ed. Geneva: International Union Against Cancer; 1974.
56. Beahrs OH, Henson DE, Hutter RVP, et al. American Joint Committee on Cancer Manual for Staging of Cancer. 4th ed. Philadelphia, PA: JB Lippincott;1992.
57. Hermanek P, Schrott KM. Evaluation of the new tumor, nodes and metastases classification of renal cell carcinoma. *J Urol* 1990; 144:238-241.
58. Lang H, Jacqmin D: Prognostic factors in renal cell carcinoma. EAU Update Series 2003, 1:215-219.
59. Crotty TB, Farrow GM, Lieber MM. Chromofobe cell renal carcinoma: Clinicopathological features of 50 cases. *J Urol.* 1995; 154: 964-967.
60. Skinner DG, Colvin RB, Vermillion CD, Pfister RC, Leadbetter WF. Diagnosis and management of renal cell carcinoma: a clinical and pathologic study of 309 cases. *Cancer* 1971; 28: 1165- 1177
61. Jenette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG. Renal Neoplasms. In: Grignon DJ, Eble JN. Heptinstall's Pathology of the Kidney, Sixth Edition, Lippincott Williams & Wilkins. 2007; 29: 1502- 1518
62. Delahunt B: Histopathologic prognostic indicators for renal cell carcinoma. *Semin Diagn Pathol.* 1998;15: 68-76
63. Mueller-Lisse UG, Mueller-Lisse UL, Meindl T, Coppenrath E, Degenhart C, Graser A, Scherr M, Reiser MF: Staging of renal cell carcinoma. *Eur Radiol* 2007, 17: 2268–2277
64. Rioux-Leclercq NR, Karakiewicz PI, Trinh QD, Ficarra V, Cindolo L, de la Taille A, Tostain J, Zigeuner R, Mejean A, Patard JJ: Prognostic ability of simplified nuclear grading of renal cell carcinoma. *Cancer* 2007, 109:868-994
65. Klöppel G, Knöfel WT, Baisch H, Otto U: Prognosis of renal cell carcinoma related to nuclear grade, DNA content and Robson stage. *Eur Urol.* 1986; 12:426-431
66. Bretheau D, Lechevallier E, de Fromont M, Sault MC, Rampal M, Coulange C: Prognostic value of nuclear grade of renal cell carcinoma. *Cancer* 1995; 76:2543-2549
67. Gudbjartsson T, Hardarson S, Petursdottir V, Thoroddsen A, Magnusson J, Einarsson GV: Histological subtyping and nuclear grading of renal cell carcinoma and their implications for survival: A retrospective nation-wide study of 629 patients. *Eur Urol.* 2005; 48: 593-600
68. Zisman A, Pantuck AJ, Figlin RA, et al. Validation of the ucla integrated staging system for patients with renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2001; 19:3792-3793.
69. Kattan MW, Reuter V, Motzer RJ, et al. A postoperative prognostic nomogram for renal cell carcinoma. *J Urol.* 2001; 166:63-67.
70. Frank I, Blute ML, Chevillie JC, et al. An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGN score. *J Urol.* 2002; 168:2395-2400.

71. Patard JJ, Leray E, Cindolo L, et al. Multi-institutional validation of a symptom based classification for renal cell carcinoma. *J Urol.* 2004; 172:858-862.
72. Lane BR, Kattan MW. Predicting outcomes in renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol.* 2005; 15:289-297.
73. Bui MH, Visapaa H, Seligson D, et al. Prognostic value of carbonic anhydrase IX and KI67 as predictors of survival for renal clear cell carcinoma. *J Urol.* 2004; 171:2461-2466.
74. Weigel D, Jürgens G, Küttner F, Seifert E, Jäckle H. The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell.* 1989; 57 (4): 645–658.
75. Lehmann OJ, Sowden JC, Carlsson P, Jordan T, Bhattacharya SS. Fox's in development and disease. *Trends in Genetics.* 2003; 19(6):339–344.
76. Maiese K, Chong ZZ, Shang YC, Hou J. Clever cancer strategies with FoxO transcription factors. *Cell Cycle.* 2008; 7:3829–3839.
77. Van der Horst A, Burgering BM. Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8:440–450.
78. Dong XC, Copps KD, Guo S, Li Y, Kollipara R, DePinho RA, et al. Inactivation of hepatic Foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation. *Cell Metab.* 2008; 8:65–76.
79. K. Maiese et al. Sly as a FOXO: new paths with Forkhead signaling in the brain. *Curr. Neurovasc. Res.* 2007; 4: 295–302
80. Obsil T, Obsilova V. Review Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene.* 2008; 27(16):2263-75.
81. Donnelly SR, Moss SE. Annexins in the secretory pathway. *Cell Mol Life Sci.* 1997; 53 (6): 533–8.
82. Gerke V, Moss SE. Annexins: From structure to function. *Physiol Rev.* 2002; 82:331–371.
83. Hayes MJ, Moss SE. Annexins and disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 322:1166–1170.
84. Hayes MJ, Longbottom RE, Evans MA, Moss SE. Annexinopathies. *Subcell Biochem.* 2007; 45:1–28.
85. Emoto K, Sawada H, Yamada Y, Fujimoto H, Takahama Y, Ueno M, et al. Annexin II over-expression is correlated with poor prognosis in human gastric carcinoma. *Anticancer Res.* 2001; 21:1339–1345.
86. Esposito I, Penzel R, Chaib-Harrireche M, Barcena U, Bergmann F, Riedl S, et al. Tenascin C and annexin 2 expression in the process of pancreatic carcinogenesis. *J Pathol* 2006; 208:673–685.
87. Zimmermann U, Woenckhaus C, Pietschmann S, Junker H, Maile S, Schultz K, et al. Expression of annexin 2 in conventional renal cell carcinoma is correlated with Fuhrman grade and clinical outcome. *Virchows Arch.* 2004; 445:368–374.
88. Syed SP, Martin AM, Haupt HM, Arenas-Elliot CP, Brooks JJ. Angiostatin receptor annexin 2 in vascular tumors including angiosarcoma. *Hum Pathol.* 2007; 38:508–513.

89. Yee DS, Narula N, Ramzy I, Boker J, Ahlering TE, Skarecky DW, et al. Reduced annexin II protein expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2007; 131:902–908.
90. Mai J, Waisman DM, Sloane BF. Cell surface complex of cathepsin B/annexin II tetramer in malignant progression. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1477:215–230.
91. Diaz VM, Hurtado M, Thomson TM, Reventos J, Paciucci R. Specific interaction of tissue-type plasminogen activator (t- PA) with annexin II on the membrane of pancreatic cancer cells activates plasminogen and promotes invasion in vitro. *Gut* 2004; 53:993–1000.
92. Sharma MR, Rothman V, Tuszynski GP, Sharma MC. Antibodydirected targeting of angiostatin's receptor annexin II inhibits Lewis lung carcinoma tumor growth via blocking of plasminogen activation: possible biochemical mechanism of angiostatin's action. *Exp Mol Pathol.* 2006; 81:136–145.
93. Hastie C, Masters JR, Moss SE, Naaby-Hansen S. Interferon- γ reduces cell surface expression of annexin 2 and suppresses the invasive capacity of prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 2008; 283:12595–12603.
94. Oh P, Li Y, Yu J, Durr E, Krasinska KM, Carver LA, et al. Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy. *Nature* 2004; 429:629–635.
95. Sheikh MS, Fornace AJ. Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol.* 2000; 182: 171-181.
96. Tannapfel A, Weber A. Tumor markers in squamous cell carcinoma of the head and neck: clinical effectiveness and prognostic value. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001; 258:83-88.
97. Shin DM, Lee JS, Lippman SM, Lee JJ, Tu ZN, Choi G, Heyne K, Shin HJC, Ro JY, Goepfert H, Hong WK, Hittelman WN. p53 expression: predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1988; 519-529.
98. Augusto L, Dennis AC. Cancer progression and p53. *Lancet* 1995; 346: 1009-1112.
99. Mostafapour SM, Hockenbery DM, Rubel EW. Life and death in otolaryngology. Mechanisms of apoptosis and its role in the pathology and treatment of disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1994; 125: 729-737.
100. Merritt AJ, Potten CS, Kemp CJ, Hickman JA, Balmain A, Lane DP. The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53- deficient mice. *Cancer Res.* 1994; 54(3): 614-617.
101. WaldmanT, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res.* 1995; 55(22): 5187-5190.
102. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25(4): 177-181.
103. Saint F, Le Frere Belda MA, Quintela R, Hoznek A, Patard JJ, Bellot J, Popov Z, Zafrani ES, Abbou CC, Chopin DK. Pretreatment p53 nuclear overexpression as a prognostic marker in superficial bladder cancer treated with Bacillus Calmette-Guerin (BCG). *Eur Urol.* 2004; 45(4): 475-482.
104. Sheikh MS, Fornace AJ. Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol.* 2000; 182(2): 171-181.

105. Zhang L, Yu D, Hu M, Xiong S, et al. Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* 2000; 60: 3655-3661.
106. Moch H, Sauter G, Moore D, Mihatsch M J, et al. p53 and erb38 protein overexpression are associated with early invasion and metastasis in bladder cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1993; 423: 329.
107. Hofmockel G, Wittmann A, Dammrich J, Bassukas ID. Expression of p53 and bcl-2 in primary locally confined renal cell carcinomas: no evidence for prognostic significance. *Anticancer Res.* 1996; 16:3807–3811.
108. Tuna B, Yorukoglu K, Tuzel E, Guray M, et al. Expression of p53 and mdm2 and their significance in recurrence of superficial bladder cancer. *Pathol Res Pract.* 2003; 199: 323-328.
109. Pinto AE, Monteiro P, Silva G, Ayres JV, et al. Prognostic biomarkers in renal cell carcinoma: relevance of DNA ploidy in predicting disease-related survival. *Int J Biol Markers.* 2005; 20: 249-256.
110. Libertino JA, Zinman L, Watkins EJR. Long-term results of resection of renal cell cancer with extension into inferior vena cava. *J. Urol* 1981; 125:164.
111. Lohse CM, Blute ML, Zincke H, Weaver AL, Cheville JC. Comparison of standardized and nonstandardized nuclear grade of renal cell carcinoma to predict outcome among 2042 patients. *Am J Clin Pathol.* 2002; 118:887-886.
112. Hendrickson MR, Longacre TA, Kempso RL. Theuterin corpus. In: Mills SE, Carter D, Reuter VE Greenson JK, Stoler Mh, Oberman HA Steinberg's diagnostic surgical Pathology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2004; (2): 1955-71.
113. Ohno Y, Izumi M, Kawamura T, Nishimura T, Mukai K, M Tachibana Annexin II represents metastatic potential in clear-cell renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer* 2009; 101, 287 – 294.
114. Noon AP1, Polański R, El-Fert AY, Kalirai H, Shawki H, Campbell F, Dodson A, Eccles RM, Lloyd BH, Sibson DR, Coupland SE, Lake SL, Parsons K, Vlatković N, Boyd MT. Combined p53 and MDM2 biomarker analysis shows a unique pattern of expression associated with poor prognosis in patients with renal cell carcinoma undergoing radical nephrectomy. *BJU Int.* 2012; 109(8):1250-7.
115. Cho DS, Joo HJ, Oh DK, Kang JH, Kim YS, Lee KB, Kim SJ. Cyclooxygenase-2 and p53 expression as prognostic indicators in conventional renal cell carcinoma. *Yonsei Med J.* 2005; 28:46(1):133-40.
116. Tomasino RM1, Morello V, Tralongo V, Nagar C, Nuara R, Daniele E, Curti M, Orestano F. p53 expression in human renal cell carcinoma: an immunohistochemical study and a literature outline of the cytogenetic characterization. *Pathologica.* 1994; 86(3):227-33.
117. Wu Y, Elshimali Y, Sarkissyan M, Mohamed H, Clayton S, Vadgama JV. Expression of FOXO1 is associated with GATA3 and Annexin-1 and predicts disease-free survival in breast cancer. *Am J Cancer Res.* 2012; 2(1):104-115.
118. Zigeuner R, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Langner C. Value of p53 as a prognostic marker in histologic subtypes of renal cell carcinoma: a systematic analysis of primary and metastatic tumor tissue. *Urology.* 2004; 63(4):651-5.