

Kolon Poliplerinde WT1 Ekspresyonunun İncelenmesi

An Investigation of WT1 Expression in Colon Polyps

Öz

Amaç: WT1, ilk olarak Wilms tümörü gelişimini etkileyen tümör baskılayıcı bir gen olarak tespit edilmiş olsa da, kolon kanseri gibi bazı malignitelerde ekspresyonunun arttığı, dolayısıyla onkojenik özelliklerinin olduğu da bildirilmektedir. Bu çalışmanın amacı WT1 ekspresyonunun hastanın yaşına, cinsiyetine, örneğin alındığı bölgeye ve patolojik tanı türüne göre değişip değişmediğini tespit etmektir.

Gereç ve Yöntemler: Patoloji anabilim dalına gönderilmiş kolon polipli 32 hastaya ait parafin blokların ve patoloji raporlarının retrospektif histopatolojik değerlendirilmesi yapılmıştır. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular: WT1 ekspresyonu ile hasta yaşı ortalaması, cinsiyet, lokalizasyon, çap, histopatolojik tanı parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki izlenmedi (sırasıyla $p=0,235$; $p=0,423$; $p=0,338$; $p=0,719$; $p=0,338$). Bununla birlikte OR (odds ratio) değerleri dikkate alındığında ise klinik olarak anlamlı farklılıklar olduğu görüldü. Pozitif boyanma; adenomlarda (neoplastik grup) poliplere (non neoplastik grup) göre 4,308 kat ($OR=4,308$), transvers kolondan anüse kadar olan kısımda transvers kolona göre 4,308 kat ($OR=4,308$), ve kadınlarda erkeklere göre 2,333 kat ($OR=2,333$) daha yüksekti.

Tartışma ve Sonuç: Çalışmamızın bulguları poliplerde WT1 ekspresyonu ile cinsiyet, tanı ve biyopsinin alındığı yer arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olmadığını, fakat OR değerleri dikkate alındığında klinik olarak anlamlı farklılıkların olduğunu düşündürmektedir. Rutin immünohistokimyasal inceleme ile WT1 ekspresyonu olan benign ve prekanseröz poliplerin tespiti, kolon tümörleri bakımından yüksek risk altındaki bireylerde WT1 immünoterapisinin ve aşı etkinliğinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunabilir.

Anahtar Sözcükler: polip; adenom; WT1

Abstract

Aim: Although WT1 was first identified as a tumor suppressor gene affecting Wilms' tumor development, it has also been reported that its expression increases in certain malignancies such as colon cancer, and that it therefore has oncogenic properties. In this study, we aimed to determine dependence of WT1 expression on patient age and sex, type of pathological diagnosis, and the sample-taking area.

Materials and Methods: Paraffin-embedded blocks and pathology reports of 32 patients with colon polyps that had been sent to pathology department were histopathologically reviewed retrospectively. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: No statistically significant relationship was observed between WT1 expression and the parameters of mean patient age, sex, localization, diameter, and histopathological diagnosis ($p=0.235$, $p=0.423$, $p=0.338$, $p=0.719$, $p=0.338$, respectively). However, when OR (odds ratio) values were considered, it was thought that there were clinically significant differences. Positive staining was 4.308 times higher in adenomas (neoplastic group) than in polyps (nonneoplastic group) ($OR=4.308$), 4.308 times higher in the portion from the transverse colon to the anus than in the transverse colon ($OR=4.308$), and 2.333 times higher in women than in men ($OR=2.333$).

Discussion and Conclusion: The study findings suggest that there is no statistically significant relationship between presence of WT1 expression in polyps and sex, diagnosis, and sample-taking area, but that there is clinically significant differences when OR values are considered. Detection of benign and precancerous polyps with WT1 expression through routine immunohistochemical examination could contribute to better understanding WT1 immunotherapy and vaccine efficacy in individuals at high risk of developing colonic tumors.

Keywords: polyps; adenoma; WT1

Ali Aslan¹, Havva Erdem²,
Mürüvvet Akçay Çelik², Arzu Şahin¹,
Soner Çankaya³

¹ Ordu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD, Ordu, Türkiye

² Ordu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji AD, Ordu, Türkiye

³ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yaşar Doğu Spor Bilimleri Fakültesi Spor Yöneticiliği Bölümü, Samsun, Türkiye

Geliş Tarihi /Received : 20.11.2017

Kabul Tarihi /Accepted: 04.03.2018

DOI: 10.21673/anadoluklin.364563

Sorumlu Yazar/Corresponding Author

Ali Aslan

Ordu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD, Ordu, Türkiye

E-posta: draslan@yahoo.com

GİRİŞ

WT1'in 11p13 kromozomunda lokalize, Wilms tümörü oluşumunu baskılayan bir gen olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir (1,2). Bununla birlikte, son yıllarda, bazı tümörlerde WT1'in aşırı eksprese edildiği saptanmıştır. Bu tümörler normalde WT1'i eksprese etmeyen dokularda ve gende hiçbir mutasyon tanımlanmadığı halde ortaya çıktığından WT1 ekspresyonunun bu tümörlerde onkojenik bir rol oynayabileceği öne sürülmüştür. Ancak, WT1'in tümör gelişimi sırasında mı eksprese edildiği tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca tümörlerde görülen ekspresyonun, hücrelerde diferansiyasyon bozukluğuna veya tümörün kök hücre kaynaklı olabileceğine işaret edebileceği öne sürülmüştür (2). Ancak kolon kanserlerindeki en önemli predispozan faktör olan kolon polip subtipleri ile WT1 ekspresyonu arasındaki ilişki netleştirilememiştir (3). Biz de bu nedenle, kolonoskopi ile müdahale edilen bir dizi kolon polibi vakasında WT1 ekspresyonu olup olmadığını ve ekspresyonun klinik parametrelerle ilişkisini araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmaya, Ocak 2015—Ocak 2016 döneminde patoloji anabilim dalına gönderilmiş olan kolon polipli 32 hastaya ait materyal dahil edildi. Hastalara ait parafin bloklar ve patoloji raporları tekrar değerlendirildi. Yaş, cinsiyet, yerleşim yeri, polibin çapı gibi bilgiler patoloji raporlarından derlendi. Poliplerin histopatolojik tipleri tekrar değerlendirildi. Parafin bloklardan 3 mikronluk kesitler alınarak WT1 antikörünün (*LEICA/Novocastra NCL-L-WT1-562 Wilms' Tumor [WT49]*) *Leica Bond* otomatik doku boyama cihazıyla immunohistokimyasal boyaması yapıldı. Işık mikroskopik değerlendirmesi gerçekleştirildi ve boyanma şiddeti ve yaygınlığı derecelendirildi; boyanma gösterenler "pozitif" (var), boyanma göstermeyenler "negatif" (yok) olarak değerlendirildi (Görsel 1-3). Daha sonra verilerin istatistiksel hasta parametreleri ile ilişkisi ortaya kondu. Bu çalışma protokolü, Ordu Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 15-24 numaralı karar ile gözden geçirilip onaylanmıştır.

Araştırma sonucunda WT1 ekspresyonu (pozitif boyanma) saptanan hastaların yaş dağılımları arasında fark olup olmadığı Student t-testi ile, WT1 ekspresyo-

nunun cinsiyete, polibin lokalizasyonuna ve patolojik tipine göre değişip değişmediği (Fisher kesin) ki-kare testi ile değerlendirilmiştir. Araştırma bulguları; n, ortalama ve standart sapma veya yüzde olarak ifade edilmiştir. Bulgular, $p < 0,05$ önem seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Tüm istatistiksel hesaplamalar SPSS (v. 21.0) programıyla yapılmıştır.

BULGULAR

Araştırma bulguları WT1 ekspresyonu varlığı ve hasta yaşı dağılımı bakımından şu şekildedeydi: 61,29±7,16 (yok); 56,67±13,80 (var); $p=0,235$. Cinsiyet dağılımı 10 (%41,7) erkek, 5 (%62,5) kadın şeklinde olup $p=0,423$ idi. Boyut açısından değerlendirildiğinde ise 8,12±6,97 mm (yok), 8,93±5,51 mm (var) şeklindeydi ve $p=0,719$ idi (Tablo 1). Pozitif vaka sayısının örneğin alındığı yer açısından dağılımı ise şöyleydi: transvers kolondan anüse kadar olan kısımda; inen kolonda 1 (%20), rektumda 1 (%33,3), sigmoid kolonda 12 (%66,7), splenik fleksurada 0 (%0); transvers kolonda ise 1 (%20) ($p=0,338$). Patolojik tanı dağılımı; adenomatöz polip 6 (%60), hamartomatöz polip 0 (%0), hiperplastik polip 1 (%25), tübüler adenom 2 (%25) ve tübülovillöz adenom 6 (%66,7) şeklindeydi ve $p=0,274$ idi. Bu bulgularla istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi. Displazik epitel içermeleri açısından adenomatöz polip, tübüler adenom, tübülovillöz adenomlar "neoplastik polip" (adenom) olarak gruplandırıldı. Hiperplastik polip ve hamartomatöz polip ise "non-neoplastik polip" (polip) olarak gruplandırıldı. Yirmi yedi vaka adenom, 5 vaka polip vakası olarak değerlendirildi. Adenom vakalarında pozitif boyanma oranı %51,9, negatif boyanma oranı ise %48,1 idi. Polip vakalarında pozitif boyanma oranı %20, negatif boyanma oranı ise %80 olarak değerlendirildi. Adenomlarda polioplere oranla pozitif boyanmanın daha yüksek olduğu görüldü (%51,9 ; %20) (Tablo 2).

Araştırma bulguları polioplere WT1 ekspresyonu ile cinsiyet, tanı ve örneğin alındığı yer arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olmadığını, OR (*odds ratio*) değerleri dikkate alındığında ise klinik olarak anlamlı farklılıkların olduğunu düşündürmektedir. Pozitif boyanma; adenomlarda (neoplastik grup) polioplere (non-neoplastik grup) göre 4,308 kat (OR=4,308), transvers kolondan anüse kadar olan kısımda transvers kolona göre 4,308 kat (OR=4,308), ve kadınlarda

Tablo 1. WT1 boyanma durumuna göre yaş ve boyut dağılımı

	WT1 Boyanma Durumu				p
	Negatif (Yok)		Pozitif (Var)		
	Ortalama	Standart sapma	Ortalama	Standart sapma	
Yaş	61,29	7,16	56,67	13,80	0,235
Boyut (mm)	8,12	6,97	8,93	5,51	0,719

Tablo 2. Cinsiyet, patolojik tanı ve örneğin alındığı yere göre WT1 dağılımı

	WT1		ki-kare	p
	Negatif (Yok)	Pozitif (Var)		
Cinsiyet	n (%)			
Erkek	14 (58,3)	10 (41,7)	1,046	0,423
Kadın	3 (37,5)	5 (62,5)		

Patolojik tanı				
Adenom	13 (48,1)	14 (51,9)	1,719	0,338
Polip	4 (80,0)	1 (20,0)		

Örneğin alındığı yer				
Transvers kolon	4 (80,0)	1 (20,0)	1,719	0,338
Transvers kolondan anüse kadar olan kısım	13 (48,1)	14 (51,9)		

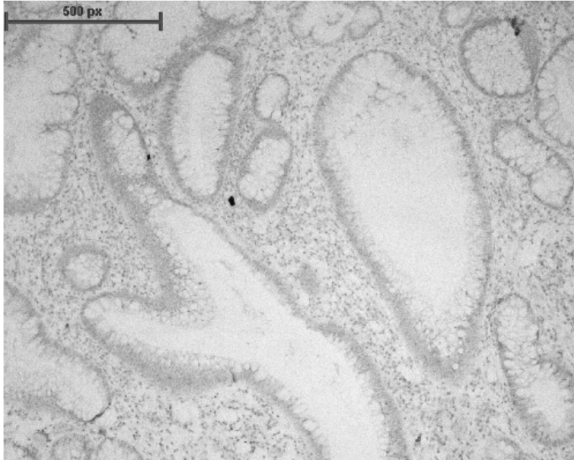
erkeklerle göre 2,333 kat (OR=2,333) daha yüksekti.

TARTIŞMA

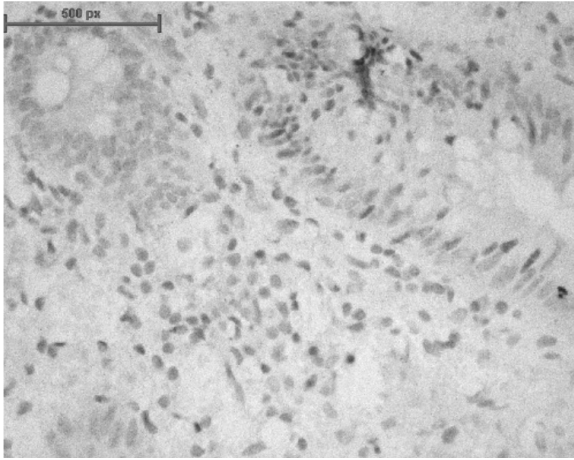
Kanser, dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunu olup, ABD ve Türkiye'deki ölümlerin önde gelen ikinci nedenidir (4,5). Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı'nın 2017'de yayımladığı 2014 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri'ne göre tüm yaş gruplarındaki kadın ve erkeklerde en sık görülen üçüncü kanser tipi kolorektal kanserlerdir. Neoplastik poliplerin kolorektal kanserlerin >%90'ından sorumlu olduğu bildirilmektedir (6). Kolorektal polipler histolojik olarak neoplastik veya non-neoplastik olarak sınıflandırılırlar. Poliplerin çoğu taramalar veya diğer tanısal prosedürler sırasında bulunan küçük, non-neoplastik lezyonlardır. Malignite potansiyeli ve belirli aralıklarla takibi polibin türüne bağlıdır. Histolojik sınıflandırmada kolon polipleri non-neoplastik ve neoplastik (adenomatöz) polipler olarak ikiye ayrılmaktadır. Non-neoplastik kolon polibi subtipleri hiperplastik, hamartomatöz, lenfoid ve enflamatuvar olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır. Neoplastik kolon polipleri ise tübüler adenom, tübülovillöz adenom ve villöz adenom olarak üç gruba ayrılmaktadır. Tüm adenom-

larda bir displazi potansiyeli mevcuttur. Klasik olarak, adenomların malignite potansiyellerinin polip subtipi, displazi boyutu ve displazi derecesi ile korele olduğuna inanılmaktadır (7). Kolorektal kanserlerde prognoz; tümörün patolojisi ve klinik bulguların yanı sıra, hastanın yaşı ile tümörün lokalizasyonu, boyutları ve morfolojisi gibi faktörlere de bağlıdır (8).

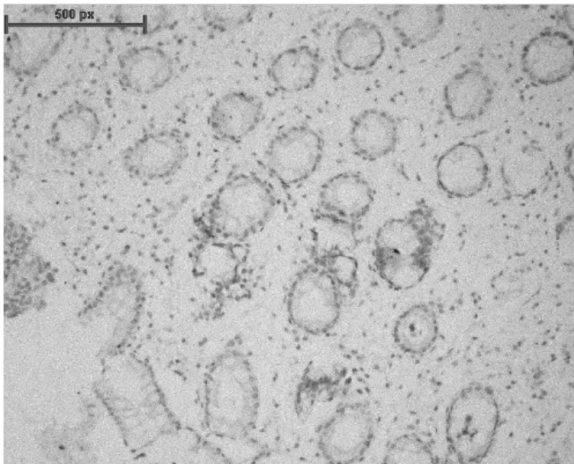
WT1 geni başta çocukluğun böbrek neoplazmi olan Wilms tümörlerini baskılayıcı bir gen olarak izole edildi. Bununla birlikte, WT1 geninin çeşitli kanserlerin tümörogenezinde onkojenik bir rol oynadığı varsayılmaktadır (9). Wilms tümörü supresör geninin (WT1), akut ve kronik lösemilerde ve meme ve akciğer kanseri dahil çeşitli malignitelerde aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir. Normal dokuda eksprese edilmez (10,11). Özofageal displazilere yönelik çalışmalarda displazi şiddeti arttıkça WT1 ekspresyonunun arttığı, hatta *in situ* ve invaziv kanser ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca aşırı ekspresyonunun tümörogenezde önemli rol oynadığı ifade edilmiştir (9,12). WT1 proteini nükleusta lokalize bir transkripsiyon faktörü olarak bilinmektedir. Bununla birlikte, WT1 proteininin sitoplazmik boyanma gösterebileceği ve bu nedenle transkripsiyon faktörü olma dışında da muhtemel



Görsel 1. Tübüler adenomda WT1 pozitif boyanma izlendi (WT1x100)



Görsel 2. Adenomda düşük dereceli displazide pozitif nükleer boyanma izlendi (WT1x400)



Görsel 3. Hiperplastik polipte WT1 ile boyanma izlenmedi (WT1x200)

fonksiyonları olabileceği iddia edilmiştir (9,13). Bu çalışmada da hafif derecede sitoplazmik boyanma izlenmiştir. Nükleer boyanma izlenmemiştir. WT1'in, transkripsiyonel aktivasyon ve/veya protoonkogenlerin upregülasyonu yoluyla hücre apoptozunu inhibe etmesinin mümkün olabileceği iddia edilmiştir (14). Bu iddia displazi ve tümörögenizde artan ekspresyonun sebebi olabilir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, WT1'in KRAS sinyalizasyonunun iletiminde kilit düzenleyici olabileceğini ve sitotoksik strese karşı apoptozla yanıt oluşturmada rol oynayarak kanserojen etki gösterebileceğini ortaya koymuştur (15). Ek olarak, invazyon, migrasyon ve metastazı kolaylaştırabileceği, anjiyogenezi ve kanser hücrelerinde ilaç direncini artırabileceği belirtilmiştir (16–20). Literatürde WT1 ile kolon kanseri arasındaki ilişkiyi araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır ve bunların sonuçları çelişkilidir. Wu ve ark. kolorektal kanserlerde myc, WT1, mir-34a ve LEF1'in TF-gen-microRNA ağı merkezinde olduğunu belirtmiş, bu bulguların teşhis ve tedavide potansiyel hedeflerin belirlenmesine yardımcı olacağını ifade etmişlerdir (21). Geniş genom tarama analizinde, WT1'in Wnt/beta katenin sinyal yolunu düzenleyen genlerin ekspresyonunu da yönettiği tespit edilmiştir (22). Kolonik epiteldeki displazi ile ilişkili olması muhtemelen bu yolla olmaktadır. Displazinin derecesi ve invaziv kanser vakaları bu çalışmaya alınmamıştır. Bununla birlikte, istatistiksel olarak ortaya konmasa bile ($p=0,338$) klinik olarak displazi (adenomların tümü düşük dereceli displazi içermektedir) değerlendirildiğinde WT1 ekspresyonu ile arasında ilişki olabileceği düşünülmüştür. Pozitif boyanmanın adenomlarda (neoplastik grup) poliplere (non neoplastik grup) göre 4,308 kat ($OR=4,308$) yüksek olduğu görülmüştür.

Yerleşim yerinin ve çapının polibin tipi ile ilişkili olabileceği bilinmektedir. Bu çalışmada yerleşim yeri ve çapı ile WT1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmesi de ($p=0,719$; $p=0,338$), örneğin alındığı yere göre, transvers kolona kıyasla transvers kolondan anüse kadar olan kısımda WT1 ekspresyonunun 4,308 kat daha yüksek olduğu görülmüştür ($OR=4,308$). İstatistiksel olarak anlamlı ilişki elde edilememesi vaka sayısının az olmasından kaynaklanabilir.

Kolorektal polipler sıklıkla hiperplastik özellikte

olup genellikle 5 mm altındadırlar ve displazi içermezler (23). Bu çalışmada hiperplastik poliplerin ortalama çapı WT1 ekspresyonu olan vakalarda 8,93 mm, olmayanlarda ise 8,12 mm idi. Yaş ortalaması ise WT1 ekspresyonu olan vakalarda 56,67 olmayanlarda 61,29 idi. WT1 ekspresyon varlığının polip çapı arttıkça artması ve yine ters olarak yaş azaldıkça artması dikkat çekicidir.

Sonuç olarak bu çalışmada kolorektal poliplerdeki WT1 ekspresyonunun, kadınlarda transvers kolondan anüse kadar olan kısımda bulunan adenomlarda (neoplastik grup) daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Neoplastik poliplerdeki displazi derecesi düşük olup, yüksek dereceli displazi gösteren adenomlar ve karzinomlarla ilişki açısından daha kapsamlı bir çalışma yararlı olabilir.

KAYNAKLAR

- Hohenstein P, Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum Mol Genet.* 2006;15(2):196–201.
- Colucci PM, Yale SH, Rall CJ. Colorectal polyps. *Clin Med Res.* 2003;1(3):261–2.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2017;67:7–30.
- T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Türkiye Kanser İstatistikleri. http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/2014-RAPOR._uzun.pdf.
- Yamaner S. Kolorektal polipler. *Kolon Rektum Hast Derg.* 2007;17:1–8.
- Ince AT, Ovunc O. Kolon polipleri ve kromoendoskopisi. *Güncel Gastroenteroloji Derg.* 2003;7:255–65.
- Haber DA, Buckler AJ, Glaser T, Call KM, Pelletier J, Sohn RL ve ark. An internal deletion within an 11p13 zincfinger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell.* 1990;29;61(7):1257–69.
- Türkiye İstatistik Kurumu. Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2016. www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=24572.
- Oji Y, Yano M, Nakano Y, Abeno S, Nakatsuka S, Ikeba A ve ark. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in esophageal cancer. *Anticancer Res.* 2004;24:3103–8.
- Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, Minden MD. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia.* 2007;21:868–76.
- Sugiyama H. WT1 (Wilms' tumor gene 1): biology and cancer immunotherapy. *Jpn J Clin Oncol.* 2010;40:377–87.
- Stoner GD, Gupta A. Etiology and chemoprevention of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 2001;22:1737–46.
- Niksic M, Slight J, Sanford JR, Caceres JF, Hastie ND. The Wilms' tumour protein (WT1) shuttles between nucleus and cytoplasm and is present in functional polysomes. *Hum Mol Genet.* 2004;13:463–71.
- Tatsumi N, Oji Y, Tsuji N, Tsuda A, Higashio M, Aoyagi S ve ark. Wilms' tumor gene WT1-shRNA as a potent apoptosis-inducing agent for solid tumors. *Int J Oncol.* 2008;32:701–11.
- Hartkamp J, Carpenter B, Roberts SG. The Wilms' tumor suppressor protein WT1 is processed by the serine protease HtrA2/Omi. *Mol Cell.* 2010;37:159–71.
- Wu C, Zhu W, Qian J, He S, Wu C, Chen Y ve ark. WT1 promotes invasion of NSCLC via suppression of CDH1. *J Thorac Oncol.* 2013;8:1163–9.
- Vicent S, Chen R, Sayles LC, Lin C, Walker RG, Gillespie AK ve ark. Wilms tumor 1 (WT1) regulates KRAS-driven oncogenesis and senescence in mouse and human models. *J Clin Invest.* 2010;120:3940–52.
- Brett A, Pandey S, Fraizer G. The Wilms' tumor gene (WT1) regulates E-cadherin expression and migration of prostate cancer cells. *Mol Cancer.* 2013;12:3.
- McCarty G, Awad O, Loeb DM. WT1 protein directly regulates expression of vascular endothelial growth factor and is a mediator of tumor response to hypoxia. *J Biol Chem.* 2011;286:43634–43.
- Han Y, Yang L, Suarez-Saiz F, San-Marina S, Cui J, Minden MD. Wilms' tumor 1 suppressor gene mediates antiestrogen resistance via down-regulation of estrogen receptor-alpha expression in breast cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2008;6:1347–55.
- Wu F, Yuan G, Chen J, Wang C. Network analysis based on TCGA reveal shubgenes in colon cancer. *Contemp Oncol (Pozn).* 2017;21(2):136–44.
- Kim MKH, McGarry TJ, Broin PO, Flatow JM, Golden AA, Licht JD. An integrated genome screen identifies the Wnt signaling pathway as a major target of WT1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:11154–9.
- Pohl J. Hyperplastic polyposis syndrome. *Video Journal and Encyclopedia of GI Endoscopy.* 2013;1(2):370–1.