Patoloji Bülteni 2001; 18(1): 31-34
Turkish Bulletin of Pathology 2001; 18(1): 31-34

Bazal hücreli karsinomda p53 protein ekspresyonunun immünhistokimyasal yöntemle saptanması

Detection of p53 protein expression in basal cell carcinoma by immunohistichemistry

Nilgün Kapucuoğlu [1], Esin Cengiz Boduroğlu [1], Çiğdem Irkkan [1], Işın Pak [1]
[1] *Sağlık Bakanlığı Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü, Ankara*

Bazal hücreli karsinom tanısı verilen 52 hastada tümör ve çevre sağlam dokuda immünhistokimyasal yöntemle p53 protein ekspresyonu araştırılmıştır. Lezyonlar sürekli güneş ışığı etkisinde olan yüz ve kulakta lokalizedir. Olguların yaş ortalaması 57.0577 ± 12.962'dir (aralık 33-72 yaş). Neoplastik dokuda %65.4 (34/52), hiç güneş görmeyen lokalizasyonlardan alınan tümörsüz deri içeren kontrol grubunda ise %14.3 (3/21) oranında p53 pozitifliği görülmüştür (p<0.001). Tümöre komşu sağlam dokunun görülebildiği 45 hastanın 22'sinde (%48.8) çevre sağlam dokuda p53 pozitifliği tespit edilmiştir. Bu oran da kontrol grubundan yüksektir (p<0.001). Tümör ve çevre sağlam doku p53 pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır (p<0.001). Kırk beş yaş altı ve 60 yaş üstü hastaların tümörlerinde p53 reaktivitesi açısından fark yoktur (p>0.05). Yaş ve çevre sağlam dokuda p53 boyanması arasında da ilişki tespit edilmemiştir (p>0.05).

Anahtar Kelimeler: p53 protein, bazal hücreli karsinom

In 52 basal cell carcinoma patients, p53 expression was investigated on tumor and peripheral normal skin by immunhustochemistry, Lesion were localised on face and ear which were continuously ewposed to sun. The mean age was 57.0577 ± 12.962 years (range 33-72 years) p53 positivity rate was 65.4% (34/52) in neoplastic tissues and 14.3% (3/21) in control biopsies that were taken from unexposed skin (p<0.001). There were statistically significant relationship between tumor and peripheral normal tissues, among 22 of 45 patients whose normal skin could be seen next to basal cell carcinoma. This positivity rate was higher than the control group (p<0.001). There were statistically significant relationship between tumor and peripheral normal skin p53 positivity (p<0.001). There were no difference in p53 reactivity between patients who were younger than 45 years and older than 60 years (p>0.05). There were no relationship between age and peripheral skin p53 positivity, as well (p>0.05).

Key Words: p53 protein, basal cell carcinoma

Bazal hücreli karsinom (BHK) insanlarda en sık görülen malignitedir [1]. Ultraviyole ışınları bu tümörlerin gelişiminde rol alan başlıca etyolojik faktördür [1,2].

p53 gen mutasyonları malignitelerde en sık görülen genetik anomalidir [3,4]. p53 gen ürünlerinin hasarlı DNA içeren hücrelerde onarımı sağlamak için geçici olarak proliferasyonu durdurduğu veya hasarlı hücreyi apoptosis ile ölüme gönderdiği bilinmektedir. Fonksiyonel, "wild-type" (WT) p53 gen yokluğunda, bu fonksiyon kaybolur ve genetik hasar içeren hücreler birikir, malignite gelişme riski artar [4].

Ultraviyole ışınları DNA hasarına neden olur ve WT-p53'ü indükler, böylece genetik hasarlı hücreler ortadan kaldırılmaya çalışılır [3].

Yapılan çalışmalar p53 değişikliklerinin deri kanserlerinde erken dönemde ortaya çıktığını göstermiştir [3,4]. Gelişiminde güneş ışınlarının önemli rol oynadığı nonmelanotik deri tümörlerinde de p53 geninde ultraviyole ışınlarına bağlı olduğu düşünülen mutasyonlar tespit edilmiştir [5]. Mutasyon sonucunda immünhistokimyasal (İHKsal) yöntemle tespit edilebilecek anormal p53 protein birikimi olmaktadır [3-5].

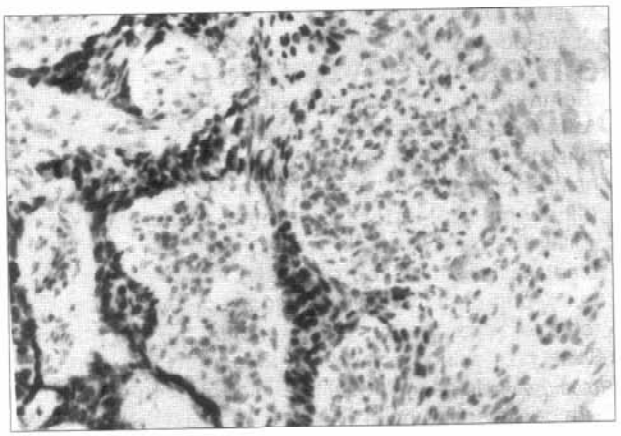
Bu çalışmada BHK'un etyopatogenezine ışık tutmak amacıyla tümör ve çevre sağlam dokuda p53 protein ekspresyonu İHKsal yöntemle araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

SB Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü'nde 1998-1999 yıllarında, yüz ve kulakta lokalize, BHK tanısı verilen 52 hastada p53 protein ekspresyonu İHKsal yöntemle araştırılmıştır .

Hasta grubunun yaş ve cinsiyet dağılımı dikkate alınarak güneş görmeyen lokalizasyonlardan alınan patoloji içermeyen 21 biyopsi de kontrol grubunu oluşturmuştur .

Anti p53 antikoru (DO7, 1:480, monoklonal, DAKO) ile boyanan kesitler tümör ve sağlam çevre doku içeren



Resim 1: Epidermis altındaki tümöral dokuda nükleer anti-p53 antikoru ile boyanma (x 100, strep ABC/HRP, DAB)



Resim 2: Sağlam epidermis, ve kıl follikülünde hücrelerin bazılarında anti-p53 antikoru ile boyanma (x100, strep ABC/HRP, DAB)

bloklardan seçilmiştir. Boyamanın diğer aşamalarında strept ABC/HRP ve kromojen olarak DAB (LabVision) kullanılmıştır.

Koyu kahve rengi nükleer boyanma pozitif olarak kabul edilmiştir. Tümörde p53 pozitifliği hiç boyanma yok: 1, %1-25: 2, %26-50: 3, %51-75: 4, %76 ve üstü: 5 olarak skorlanmıştır. Tümör çevresi sağlam doku ve kontrol dokularda da nükleer koyu kahve rengi boyanma pozitif sayılmıştır. Boyanma var/yok olarak değerlendirilmiştir.

Verilerin istatistiksel analizinde ki-kare testi kullanılmıştır. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir .

BULGULAR

Otuz biri (% 59.6) kadın, 21'i (% 40.4) erkek olan 52 hastanın yaş ortalaması 57.0577 ± 12.962'dir (aralık 33-72 yaş). Olguların 18'i (%34.6) 45 yaş ve altında, 34'ü (% 65.4) 60 yaş ve üstündedir .

Hasta grubunda neoplastik dokuda % 65.4 (34152), kontrol grubunda ise % 14.3 (3121) oranında p53 pozitifliği görülmüştür (Resim 1). Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$). p53 pozitifliğinin skora göre dağılımı tablo-I de gösterilmiştir.

Kontrol grubunda p53 pozitifliği tespit edilen 3 olgunun 2'si 45 yaş altında, 1'i ise 60 yaş üstündedir. Kontrol grubunda ve tümöre komşu sağlam epidermiste bazal ve spinöz tabaka hücre nükleusları yanı sıra deri eklerinin nükleuslarında da boyanma görülmüştür (Resim 2).

Tümöre komşu sağlam dokunun görülebildiği 45 hastanın 22'sinde (% 48.8) çevre sağlam dokuda p53 pozitifliği görülmüştür. Bu oran da kontrol grubundan belirgin olarak yüksektir ($p<0.001$). Tümöre komşu sağlam epidermisin görüldüğü 45 olgunun 18'inde (% 40) tümör ve çevre dokuda p53 pozitifliği saptanmıştır. On üç (% 28.8) olguda her ikisinde de p53 protein ekspresyonu İHKsal olarak tespit edilmemiştir. On (% 22.2) olguda tümörde boyanma görülmüştür fakat çevre dokuda boyanma yoktur. Dört (% 9) olguda ise komşu sağlam epidermiste boyanma vardır, fakat tümörde boyanma görülmemiştir (Tablo-II). Tümör ve çevre sağlam doku p53 pozitifliği arasındaki ilişki de istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$).

Kırk beş yaş ve altındaki 18 (10/18, % 55.6) hastanın ve 60 yaş ve üstündeki 34 (24/34, % 70.6) hastanın tümörlerinin p53 pozitiflikleri arasında fark yoktur ($p>0.05$). Yaş ile çevre sağlam dokuda p53 boyanması arasında da ilişki tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Tümöre komşu sağlam dokunun görülebildiği 45 hastanın yaşa göre İHKsal olarak p53 antikoru ile boyanma özellikleri tablo-III'te gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Günümüzde BHKun moleküler patogenezine dair kesin bilgiler yoktur [1,6].

Yapılan çalışmalar p53 gen değişikliklerinin deri kanserlerinin erken döneminde ortaya çıktığını ve bu değişikliklerin başlıca nedeninin güneş ışınları olduğunu göstermiştir [3,4].

Kaynaklarda BHK'da p53 ile %0-92 oranında boyanma bildirilmektedir (5). Mutant ve WT-p53'ü tespit eden DO7 antikorunun kullanıldığı çalışmamız da ise bu oran % 65.4 (34/52) olup, literatürde bildirilen değerlerle uyumludur .

Çalışmamızda olduğu gibi tümöre komşu epidermiste p53 immünreaktivitesi bulan çalışmalar vardır [1,4,7]. PCR yöntemiyle de komşu sağlam epidermiste p53 mutasyonları tespit edilmiştir [8]. Serimizde tümöre komşu sağlam dokunun görülebildiği 45 olgunun 18'inde (%40) tümör ve çevre dokuda p53 pozitifliği saptanmıştır. On üç olguda (% 28.8) ise her ikisinde de boyanma saptanmamıştır. Tümör ve çevre dokunun boyanmasının birbirinden farklı olduğu 14 (% 31.2) olgu vardır. Tümör ve çevre sağlam dokuda İHKsal olarak tespit edilen p53 boyanma özellikleri arasındaki bu kore-

boyanma	n	%
%0	18	34.6
%1-25	13	25.0
%26-50	9	17.3
%51-75	5	9.6
%76-100	7	13.5

Tablo 1: 52 bazal hücreli karsinom olgusunda immünohistokimyasal p53 boyanma oranının dağılımı.

lasyon BHK gelişirninde ultraviyole ışınlarına bağlı meydana gelen p53 mutasyonlanmn ve bunun yanı sıra başka genetik değişikliklerin rol alabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda sürekli güneş ışığı etkisi altında kalan lokalizasyonlardaki tümör ve çevre sağlam dokudaki p53 immünreaktivitesi güneş görmeyen yerlerden alınan kontrol grubundaki irnmünreaktiviteden belirgin olarak yüksektir. Bu da ultraviyole ışınlan etkisiyle p53 geninde mutasyonlar olabileceği ve bunun da tümör gelişimine neden olabileceğini desteklemektedir.

IHK ile birlikte moleküler yöntemlerin kullanılarak p53 mutasyonlarının araştırıldığı çalışmalarda birbiriyle çelişen sonuçlar bildirilmiştir [3,4,6].

PCR ile incelenen örneklerin tümör yanı sıra normal doku içermesi ve mutasyonların incelenen kodonlar dışında lokalize olması, immünhistokimyada kullanılan antikorların tüm antijenik epitopları tanıyamaması, mutant ve WT proteini ayırt etmeden reaktivite vermesinin, bu iki yöntem arasındaki değerlendirme farklarını açıklamak için yeterli olmadığı belirtilmektedir[3,4]. Ancak çalışmamızda tek bir antikor kullanılması ve moleküler yöntemlerin kullanılmaması nedeniyle bu konu irdelenememiştir.

Çalışmamızda kontrol grubunu oluşturan güneş görmeyen bölgelerden alınan 21 örneğin 3'ünde (%14.3) p53 immünreaktivitesi görülmüştür. Hall ve arkadaşları [10] ise ultraviyole ışınlarına rnaruz kalmayan örneklerinde p53 immünreaktivitesi tespit etmemişlerdir. Orofarengeal bazal hücrelerde, özofagusta, ekzoservikal mukozada p53 immünreaktivitesi bildirilmiştir [7]. Bu bulgular çalışmamızda olduğu gibi normal dokularda p53 immünreaktivitesi olabileceğini göstermektedir. p53 mutasyonu olmaksızın İHKsal boyanma görülmesi hücre diferansiasyonu, DNA onarımı, viral proteinlerle kompleks oluşturma veya yıkım yollarındaki bozukluklara bağlı olarak WT-p53 düzeyinin artmasına bağlı olabilir [7]. Çalışmamızda WT ve mutant p53 proteini tespit eden bir antikor kullanıldığı için biriken p53 proteinin niteliği anlaşılamamıştır. Mutant ve WT-p53 proteini ayrı tanıyan İHKsal antikorlar veya moleküler yöntemlerle yapılacak çalışmalar bu konuyu aydınlatacaktır.

BHKlarda yaş ve p53 protein ekspresyonu arasında ilişki olduğunu gösteren çalışmalar vardır [4]. Çalışmamızda olduğu gibi p53 immünreaktivitesi va yaş arasında ilişki bulunmayan çalışmalar da vardır [6,9]. Serimizde p53 immünreaktivitesi ve yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olmamakla birlikte 60 yaş ve üstü grupta tümöre komşu sağlam dokuda İHKsal olarak p53 boyanması olan olgu sayısı (16/30) boyanma olmayandan (14/30) çoktur. Oysa ki 45yaş ve altı grupta çevre sağlam dokuda boyanma olmayan olgu sayısı (9/15) boyanma olandan (6/15) daha fazladır. Yaşla birlikte p53 ekspresyon artışı kümülatif güneş etkisinin daha fazla olmasına, yaşlılarda güneş ışınlarına bağlı zedelenmelerin daha yavaş onarılması ve onarım yavaşladığı için daha fazla mutasyon birikmesine bağlı olabilir. Bu artış yaşla birlikte artan DNA zedelenmesine yanıt olarak artan WT-p53 sonucunda da gözlenebilir [4].

Çalışmamızda kullanılan anti-p53 antikoru WT ve mutant proteini tespit etmektedir. Bu nedenle tümör ve çevre sağlam dokuda gözlenen immünreaktivitenin nedeni anlaşılamamaktadır.

p53 pozitifliği mutasyon veya ultraviyole ışınları etkisi sonucunda artan WT-p53'e bağlı olabilir. WT ve mutant p53 proteinini ayrı olarak tanıyabilen antikorlar bu konuyu aydınlatabilir. Yapılacak olan çalışmalara moleküler yöntemlerin eklenmesiyle İHKsal olarak tespit edilen p53 proteininin niteliği anlaşılabilir, tespit edilecek mutasyonlann ultraviyoleye bağlı olup olmadığı belirlenebilir.

Böylece BHK etyopatogenezi, etyopatogenezinde ultraviyole ışınlan ve p53 geninin oynadığı rol daha net olarak ortaya konabilir.

		tümörde boyanma	
		var	yok
tümöre komşu sağlam doku boyanma	var	18/45(% 40)	4/45(% 9)
	yok	10/45(% 22.2)	13/45 (% 28.8)

Tablo 2: Tümör ve tümöre komşu sağlam dokunun görülebildiği 45 hastanın immünohistokimyasal olarak p53 ile boyanma özellikleri

	çevre sağlam dokuda boyanma	
yaş	var	yok
45 ≥	6/15(% 40)	9/15(% 60)
60 ≤	16/30(% 53.3)	14/30(%46.7)

Tablo 3: Tümöre komşu sağlam dokunun görülebildiği 45 hastada yaş ve çevre sağlam dokuda immünhistokimyasal olarak p53 ile boyanma oranları

KAYNAKLAR

1. Shea CR, McNutt NS, Volkenandt M, Lugo J, Prioleau PG, Albino AP. Overexpression of p53 protein in basal cell carcinomas of human skin. Am J Pathol 1992; 141 : 25-29.
2. Goldberg LH. Basal cell carcinoma. Lancet 1996; 347: 663-667.
3. Campbell C, Quinn AG, Angus B, Rees JL. The relation between p53 mutation and p53 immunostaining in non-melanoma skin cancer. Br J Dermatol 1993; 129: 235-241.
4. Liang S-B, Ohtsuki Y, Furİhata M, Takeuchi T, Iwata J, Chen B-K, et al. Sun-exposure -and aging -dependent p53 protein accumulation results in growth advantage for tumor cells in carcinogenesis of nonmelanocytic skin cancer. Virchows Arch 1999; 434: 193-199.
5. Wikonkal NM, Berg RJW, Van Haselen CW, Horkay I, Rmenyik E, Begany A, et al. Bcl-2 vs p53 protein expression and apoptotic rate in human nonmelanoma skin cancers. Arch Dermatol 1997; 133: 599-602.
6. Moles J-P , Moyret C, Guilmlot B, Jeanteur P , Guilhou J-J, Theillet C, et al. P53 mutations in human epithelial skin cancers. Oncogene 1993; 8: 583-588.
7. Barbareschi M, Girlando S, Cristofolini P, Cristofolini M, Togni R, Boi S. p53 protein expression in basal cell carcinomas. Histopathology 1992; 21 : 579-581.
8. Kanjilal S, Strom SS, Clayman GL, Weber RS, El-Naggar EK, Kapur V, et al. p53 mutations in nonmelanoma skin cancer of the head and neck: molecular evidence for field cancerization. Cancer Res 1995; 55: 3605-3609.
9. De Rosa G, Staibano S, Barra E, Donofrio V , Salvatore G, V essecchia G, et al. p53 protein in aggressive and non-aggressive basal cell carcinoma. J Cutan Pathol 1993; 429-434.
10. Hall PA, Mckee PH, Menage HP, Dover R, Lane DP. High levels of p53 protein in UV- irradiated normal human skin. Oncogene 1993; 3: 203-207.