

Kutanöz Malign Melanomalarda PCNA ile Değerlendirilen Proliferatif Aktivite ve bcl-2 Onkoprotein Ekspresyonu

Evaluation of the Proliferative Activity of Cutaneous Malignant Melanomas by PCNA Immunostaining and Expression of bcl-2 Oncoprotein

Özge Han¹, Fehmi Aksoy¹, Ayper Kaçar¹, Selda Seçkin¹, Sezer Kulaçoğlu¹

Malign melanomalarda proliferatif aktivite çeşitli yöntemlerle çalışılmaktadır ve prognostik önemi tartışılmaktadır. Bu çalışmanın amacı 25 kutanöz malign melanoma olgusunda proliferatif aktivite ile tümör tipi, Clark's level ve Breslow Index arasındaki ilişkinin değerlendirilmesidir. Proliferatif aktivite tümör yüzeyi ve derininde immünohistokimyasal olarak PCNA çalışılarak değerlendirilmiştir. Ayrıca apoptozis bloke edici olduğu bilinen bcl-2 onkoproteinini ile proliferatif aktivite arasındaki ilişki araştırılmıştır. PCNA boyanması semikantitatif olarak ölçülmüş, tümör hücrelerinde boyanma %10'un altında ise (+), %10-30 arasında ise (++) , %30'un üstünde ise (+++) olarak kabul edilmiştir; bcl-2 ekspresyonu ise (+) ve (-) olarak kaydedilmiştir.

Tümör yüzeyi ve derini arasında PCNA ekspresyonunda belirgin farklılık bulunmamıştır. Clark's level ve Breslow indeks ile yüzeyde ve derinde izlenen PCNA ekspresyonu arasında ilişki saptanmıştır.

Bcl-2 ekspresyonunun Clark's level veya Breslow indeksi ile ilişkisi saptanmamıştır. Tümör yüzeyi ve derininde izlenen PCNA pozitifitesi ile bcl-2 ekspresyonu arasında da ilişki gözlenmemiştir. Derinde artmış PCNA ekspresyonu ve bcl-2 pozitifliği nodüler subtip ile ilişkili görünmekteyse de serimizin sınırlı sayıda nodüler dışı tip içermesinden ötürü bu sonuca varmak için daha geniş serilerde çalışmak gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Malign Melanoma, proliferatif aktivite, PCNA, bcl-2 onkoprotein

The proliferative activity of malignant melanoma (MM) has been studied by several methods and the prognostic value of them has been discussed. The aim of this study is to evaluate the relationship between the proliferative activity and the tumor type, Clark's level and Breslow index of 25 cutaneous MM. The proliferative activity was assessed at the superficial and deep portions of the tumors by PCNA immunostaining. In addition, bcl-2 oncoprotein expression which is known to block apoptosis, has been evaluated in order to discuss if there is any correlation with the proliferative activity. For PCNA

labelling a semiquantitative method was used contributing: <10% = (+), 10-30% = (++) , >30%=(+++), Bcl-2 expression was evaluated as positive or negative. There was no significant difference in PCNA expressions between the superficial and deep portions of the tumors. It was evaluated that both Clark's level and Breslow index had been related with PCNA positivity at the superficial and the deep portions of the tumors. Bcl-2 did not seem to have a correlation neither with Clark's level and Breslow index nor PCNA expression of tumors. Although increased PCNA expression in deeper portions and bcl-2 expression appear to be related to the nodular subtype, the limited number of other subtypes in our series preserves us to make further interpretations.

Key words: Malignant melanoma, proliferative activity, PCNA, bcl-2 oncoprotein.

Yüksek proliferatif aktivite malign tümörlerin özelliğindedir. Son zamanlarda hücre siklus bağımlı antijenler tanımlanmış ve bu antijenlerin antikolar ile tespiti tümörlerin proliferatif aktivitesinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

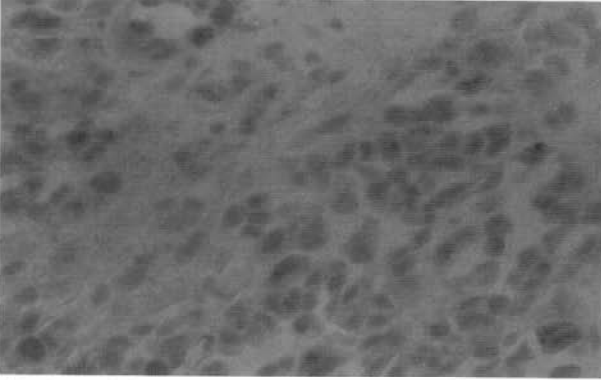
PCNA, DNA polimeraz deltanın kofaktörü olarak tanımlanmış, geç G1, S, G2 ve M fazında eksprese edilen, S fazında maksimuma ulaşan bir nükleer proteindir^(1,2,3,4,5). Diğer yandan bcl-2 ise bir protoonkogen olup apoptozisi bloke edici aktiviteye sahiptir^(6,7).

PCNA ve bcl-2 pek çok melanositik lezyonda çalışılmış, benign, borderline ve malign lezyonlar arasındaki ekspresyon farkları, histolojik subtip ve tümör kalınlığı ile ilişkileri değerlendirilmiştir.

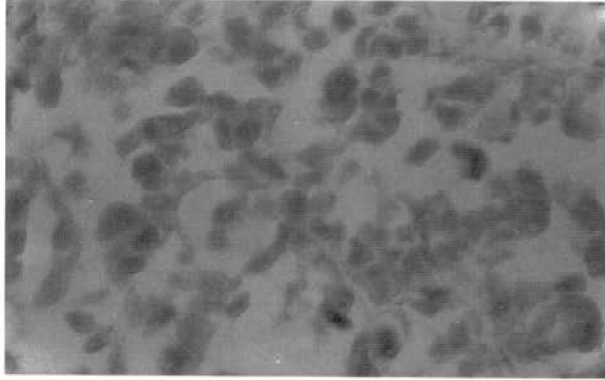
Mareel, tümör kitlesinin periferindeki hücrelerin yüksek invazyon kapasitesine sahip olduğunu vurgulamıştır⁽⁸⁾. Benzer hipotezler kolon adenokarsinomalarında derinde yer alan hücreler için de öne sürülmektedir⁽⁹⁾.

Malign melanomalarda invazyon derinliği prognozda çok önemli bir parametre olup tedavi stratejisinin seçiminde yol göstericidir. Bugüne dek malign melanomda invazyon düzeyini değerlendirmede iki sistem kullanılmıştır. Clark's level ve Breslow indeksi.

Bu çalışmada malign melanomalarda proliferatif



Resim 1 : PCNA ile tümör yüzeyinde (+++) boyanma (x200)



Resim 2 : bcl-2 ile pozitif boyanma (x200)

aktivite ve bcl-2 ekspresyonu, bunların birbirleri ile ilişkileri ve tümör tipi, Clark's level ve Breslow index ile ilişkileri değerlendirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya Ankara Numune Hastanesi Patoloji Bölümü'nde 1994-1997 yılları arasında tanı almış 25 kutanöz malign melanoma olgusu dahil edildi. Olguların histolojik tipleri, Clark's level ve Breslow indeksi değerlendirildi. Her olgu için tümör yüzeyini ve derinini temsil eden birer kesit seçildi.

Proliferatif aktivite, tümör yüzeyi ve tabanı için streptavidinbiotin tekniği ile PCNA (Dako M0879) çalışılarak immünohistokimyasal olarak değerlendirildi (Resim 1). PCNA pozitifitesi semikantitatif olarak değerlendirildi. Tümör hücrelerinde boyanma %10'un altında ise (+), %10-30 arasında ise (++) , %30'un üstünde ise (+++) olarak skorlandı. Bcl-2 ekspresyonu da immünohistokimyasal olarak streptavidin biotin tekniği ile bcl-2 (Dako N 1587) çalışılarak değerlendirildi ve boyanan olgular (+), boyanmayan olgular (-) olarak kabul edildi (Resim 2).

İstatistiksel metod: Sonuçlar istatistiksel olarak

değerlendirildi. Clark's level ve Breslow indeksi ile yüzeysel ve derinde değerlendirilen PCNA pozitifliği ve bcl-2 ekspresyonu arasındaki ilişki Spearman korelasyon katsayısı kullanılarak araştırıldı. PCNA pozitifliği ve bcl-2 ekspresyonu, arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde de aynı yöntem kullanıldı. Tümörün yüzeyinde ve derininde değerlendirilen PCNA pozitifitesi arasındaki ilişki Wilcoxon testi kullanılarak incelendi. PCNA ekspresyonu ve bcl-2 pozitifitesi ile tümör tipi arasındaki ilişki, serimizde az sayıda nodüler dışı tip bulunması nedeni ile istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.

BULGULAR

Olguların yaşları 16-84 arasında değişmekteydi. 14 kadın, 11 erkek olgu vardı. Histolojik olarak 19'u nodüler, 4'ü süperfisiyel yayılan ve 2'si akrall lentiginöz tipte idi ve bu 6 olgu vertikal gelişim fazında idi. Clark's level II ve V arasında değişmekteydi; Breslow indeksi 0,76 - 1,5 ile >4 arasındaydı.

Tümörlerin yüzeyi ve derini arasında PCNA pozitifitesi açısından anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,157$). Clark's level ile yüzeysel ve derin PCNA pozitifitesi ilişkili bulundu ($r=0,70$; $p<0,01$; $r=0,89$, $p<0,01$). Clark's level arttıkça PCNA'nın pozitif değerleri artmaktaydı. Breslow indeksi ile de yüzeyde ve derinde izlenen PCNA pozitifitesi ilişkili bulundu ($r=0,68$, $p<0,01$; $r=0,67$ $p<0,01$). Bcl-2 ekspresyonun Clark's level veya Breslow indeksi ile ilişkisi saptanmadı ($r=0$, $p=1$; $r=0,99$, $p=0,70$).

Tümör yüzeyi ve derininde izlenen PCNA pozitifitesi ile bcl-2 ekspresyonu arasında da ilişki gözlenmedi ($r=0,13$, $p>0,05$; $r=0,129$, $p>0,05$). Derinde artmış PCNA ekspresyonu ve bcl-2 pozitifliği nodüler subtip ile ilişkili görünmekteyse de serimizde sınırlı sayıda nodüler dışı tip olması nedeni ile, bu sonuca varmak için daha geniş serilerde çalışmak gerekmektedir. Sonuçlar tablo 1' de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Melanositik lezyonlarda PCNA ile yapılan çalışmalar PCNA pozitifitesi ve derecesinin benign ve malign lezyonlarda farklı bulunduğunu göstermiştir. Benign lezyonlarda daha düşük düzeyde belirlenen PCNA pozitifitesine karşın, malign lezyonlarda daha yüksek düzeyde PCNA pozitifitesi bulunmuştur. Tokuda ve ark., bir çalışmalarında benign, borderline ve malign melanositik neoplazmlarda PCNA ile proliferatif aktiviteyi değerlendirmişler, 30 malign melanoma (MM), 41 nevüs olgusu ile yapılan bu çalışmada invaziv MM ve insitu MM da melanositik nevüslerden daha yüksek PCNA pozitifitesi gözlemişlerdir⁽¹⁰⁾. İnvaziv MM da %18, insitu MM da % 11,3, nevüslerde ise %2,6 oranında belirgin pozitifite saptamışlardır. Aynı çalışmada PCNA pozitifitesinin MM derinliği ile belirgin artış göstermediği belirtilmiştir. Takahashi ve ark. da benign ve malign melanositik lezyonlarda yaptıkları benzer bir çalışmada,

Tablo 1 :

Olgu	Histolojik subtip	clark's level	Breslow index	PCNA yüzeyel	PCNA derin	bcl-2
1	NMM	v	>4	+++	+++	-
2	NMM	iv	>4	+	++	+
3	NMM	iv	>4	+	+	-
4	NMM	iv	1.5-4	-	-	-
5	NMM	iv	>4	+	+	-
6	NMM	iv	4	-	-	-
7	NMM	v	>4	+++	+++	+
8	NMM	iii	1.5-4	-	-	-
9	NMM	iv	>4	-	++	-
10	NMM	iv	>4	+	+	+
11	NMM	iv	1.5-4	-	-	+
12	NMM	v	>4	+	-	-
13	NMM	v	>4	++	+++	-
14	NMM	v	>4	+++	+++	+
15	NMM	v	>4	+	++	-
16	NMM	iv	>4	-	-	-
17	NMM	v	>4	+	+	-
18	NMM	iv	>4	++	++	-
19	NMM	iv	4	-	-	+
20	SSMM	III	0.76-1.5	+	+	-
21	SSMM	III	1.5-4	+	-	+
22	SSMM	II	0.76-1.5	+++	-	-
23	SSMM	III	1.5-4	-	-	-
24	ALMM	II	0.76-1.5	+	-	-
25	ALMM	iv	1.5-4	+++	+++	-

NMM : Nodüler malign melanoma

SSMM : Süperfişyel yayılan malign melanoma

ALMM : Akral lentiginöz malign melanoma

nevüslerde izledikleri düşük PCNA pozitivitesine karşın MM ve MM metastazlarında yüksek PCNA pozitivitesi saptamışlardır ⁽¹¹⁾. Çeşitli çalışmalarda ise PCNA düzeyi ile tümör kalınlığı arasında da ilişki bulunmuştur. Björnhagen ve ark. MM olgularında ve metastatik lezyonlarda, benign lezyonlara göre daha yüksek PCNA pozitivitesi saptamışlar ve MM olgularında kalınlıkla artan pozitivite gözlemişlerdir ⁽¹²⁾. Rieger ve ark. da PCNA ve Ki-67 ile yaptıkları bir çalışmada melanositik deri lezyonlarında PCNA ve Ki-67 ekspresyonlarının korele olduğunu, benign lezyonlara göre MM olgularında daha yüksek bulunduğunu gözlemiş, prognozda önemli parametrelerden olan Breslow indeks ile PCNA ve Ki-67 ekspresyonunun anlamlı artışını saptamışlardır ⁽¹⁾.

Bcl-2 apoptozis bloke edici bir gen olup melanositik lezyonlarda çalışılmaya başlanmıştır. Pek çok çalışmada bcl-2'nin normal epidermal melanositlerde de eksprese edildiği (kutanöz nevüs ve melanoma yanısıra) gösterilmiştir ^(6, 13).

Cerroni ve ark., benign melanositik nevüslerin %94'ü ve malign melanomaların %93'ünde bcl-2 ekspresyonu

göstermiş ve bcl-2'nin kutanöz melanositik lezyonlarda yaygın bir bulgu olduğunu, biyolojik davranışa bağlı anlamlı değişiklik göstermediğini, malign melanomalarda prognostik önemi olmadığını belirtmişlerdir ⁽¹⁴⁾. Saenz ve ark. normal melanositler ve nevüs hücrelerinde uniform, kuvvetli bcl-2 ekspresyonu saptanmış, bu onkogenin malign transformasyonda etkili olmadığını, tümör progresyonu sırasında ekspresyonunda düşüş olabileceğini belirtmişlerdir ⁽¹⁵⁾.

Biz malign melanomalarda prognozu belirlemede en önemli faktör olmasından yola çıkarak tümör yüzeyi ve derindeki proliferatif aktivite farkını gözlemlemek istedik. Ayrıca proliferatif aktivitenin yüksek olduğu tümörlerde apoptotik aktiviteyi bloke ettiği bilinen bcl-2'yi çalışarak, düşük proliferatif aktiviteye sahip tümörlerdekine göre bcl-2 ekspresyonunun farklı olup olmadığını ortaya koymaya çalıştık.

Çalışmamızda tümörün yüzeyi ve derini arasında PCNA pozitivitesi açısından farklılık bulunmadı (p=0,157). Ancak tümör yüzeyi ve derininde izlenen PCNA pozitivitesinin Clark's level ve Breslow indeks ile ilişkisi gözlemlendi. Clark's level ve Breslow indeks arttıkça

PCNA pozitifitesi artmaktaydı ($p < 0,01$). Bu bulgu, malign melanomada PCNA düzeyi ile tümör kalınlığı arasında ilişki olduğunu göstermiştir.

Bcl-2 ekspresyonunun ise Clark's level veya Breslow indeks ile ilişkisi saptanmadı ($p = 0,70$). PCNA pozitifitesi ve bcl-2 ekspresyonu arasında da herhangi bir ilişki gözlenmedi ($p > 0,05$). Bu sonuçlar, çeşitli literatürlerde belirtildiği gibi, bcl-2'nin melanositik lezyonlarda biyolojik davranışa bağlı anlamlı değişiklik göstermediğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda derinde artmış PCNA ekspresyonu ve bcl-2 pozitifliği nodüler suptip ile ilişkili görünmekteyse de, serimizin az sayıda nodüler dışı tip içermesinden ötürü, böyle bir sonuca varmak için daha geniş serilerin gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Rieger E., Hofmann-Wellenhof R., Soyer P.H., Kofler R., Cerroni L., Smolle J., et al; Comparison of proliferative activity as assessed by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 monoclonal antibodies in melanocytic skin lesions. *J Cutan Pathol* 1993, 229-236
2. Hall P.A., Levison D.A., Woods A.L., W.Yu C.C., Kellock D.B., Watkins J.A., et al; Proliferating cell nuclear antigen immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms; *J Pathol* 1990, 162: 285-294.
3. Bravo R., Frank R., Blundell P.A., MacDonald Bravo H; Cyclin / PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase 8. *Nature* 1987, 326: 515-516
4. Prelich G., Tan C.K., Kostura M., Mathews M.B., So A.G., Downey K.M. et al.; Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase 8 auxiliary protein. *Nature* 1987, 326: 517-518
5. Kurki P., Vanderlaan M., Dolbeare F., Gray J., Tan E.M.; Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) / cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res* 1989, 166: 209
6. Jay V., Yi Q., Hunter W.S., Zielenska M.; Expression of bcl-2 in uveal malignant melanoma *Arch Pathol Lab Med* 1996; 120: 497-498
7. Hankenberg D.M. Nunez G., Milliman C., Schreiber R.D., Korsmeyer S.J.; bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990, 348: 334-336
8. Smolle J., Hofmann-Wellenhof R., Kerl H.; Prognostic significance of proliferation and motility in primary malignant melanoma of the skin. *J Cutan Pathol* 1992; 19: 110-115
9. Teixeira C.R., Tsnaka S., Haruma K., Yoshihara M., Sumii K., Kajiyama G.; Proliferating cell nuclear antigen expression at the invasive tumor margin predicts malignant potential of colorectal carcinomas. *Cancer* 1994; 73: 575-579
10. Tokuda Y., Mukai K., Matsuno Y., Furuya S., Shimosato Y., Takasaki Y., et al; Proliferative activity of cutaneous melanocytic neoplasms defined by a proliferating cell nuclear antigen labelling index. *Arch Dermatol Res* 1992; 284: 319-323
11. Takahashi H., Strutton G.M., Parsons P.G.; Determination of proliferative fractions in malignant melanomas by anti-PCNA/cyclin monoclonal antibody; *Histopathology* 1991; 18: 221-227
12. Björnhagen V., Bonfoco E., Brahme E.M., Lindholm J., Auer G.; Morphometric, DNA and PCNA measurements in benign melanocytic lesions and cutaneous malignant melanoma; *Am J Dermatopathol* 1994, 16: 615-623
13. Saenz-Santamaria M, Reed JA, McNutt NS, Shera CR: Immunohistochemical expression of bcl-2 in melanomas and intradermal nevi. *J Cutan Pathol* 1994; 21 : 393-397
14. Cerroni L., Soyer H.P., Kerl H.; bcl-2 protein expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic nevi; *Am J Dermatopathol* 1995 17 : 7-11.