

Hepatoblastomlarda İmmünohistokimyasal Bulgular - Proliferating Cell Nuclear Antigen - p53 Tümör Baskılayıcı Gen*

Dr. Şükrü O. Özdamar¹, Dr. Y. Sancar Barış¹, Dr. Fatma Saltık¹,
Dr. Filiz Karagöz¹, Dr. Ender Artürk²

ÖZET

Hepatoblastomlar çocukluk çağı tümörlerindedir ve karaciğerin embriyonal gelişim aşamalarını takip eden altı histolojik alt tipi tanımlanmıştır. Bu tümörleri oluşturan hücrelerin EMA- sitokeratin, FP ve CEA ekspresyonları gösterebildikleri, özellikle mikst tip hepatoblastom olgularında nöroendokrin diferansiyasyon gösteren serotonin ve somatostatin immünoreaktif hücrelerin bulunabileceği bildirilmiştir. Bu çalışmada, immünohistokimyasal profili ortaya koymak ve ayrıca, hem malign potansiyel taşıyan tümörlerin hem de reperatif/rejeneratif aktivitenin değerlendirilebilmesine imkan sağlayan proliferatif aktivite belirleyicisi Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) ile hücre proliferasyonu üzerindeki baskılayıcı etkinin kalkmış olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilen-neoplastik dokuların en sık saptanan anomalisi-mutant p53 ekspresyonları arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla üçü fetal-embriyonel, bir ise mikst epitelyal-mezankimal tip 4 hepatoblastom olgusunun formalinde fikse parafin kesitlerinde streptavidin biotin peroksidaz yöntemiyle sitokeratin (AE1/AE3) α -fetoprotein, CEA, vimentin, S-100 protein, kromogranin, sinaptofizin, PCNA ve p53 varlıkları araştırıldı. Bütün olgularımızda sitokeratin ve α -fetoprotein, bir olguda vimentin ekspresyonları gösterildi. Nöroendokrin hücre varlığı ile p53 tümör baskılayıcı gen ürünü olgularımızdan hiçbirinde saptanmadı. Olgularımıza ait PCNA indeksleri 0.800 ile 0.990 arasında değişiyordu. Bulgularımız, farklı sonuçlar elde edilmiş çalışmalar olmasına rağmen literatürün çoğunluğu ile uyum göstermektedir.

Anahtar kelimeler : Hepatoblastoma, immünohistokimya, proliferating cell nuclear antigen, p53 onkoprotein

GİRİŞ

Hepatoblastomlar çocukluk çağı primer hepatik tümörlerinin en sık görülenidir ve çocukluk çağı karaciğer tümörlerinin %25-45'ini oluştururlar¹. Histolojik olarak altı altı tipi tanımlanan hepatoblastomlarda bu histopatolojik bölünmenin karaciğerin embri-

SUMMARY

Hepatoblastomas are childhood tumors and they have six histological subgroups according to embryological development. EMA, cytokeratin, α -fetoprotein and CEA expressions were shown in these tumors. Serotonin and somatostatin immunohistochemical expressions which might be considered due to neuroendocrine differentiation were especially found in mixt type hepatoblastomas. In this study, our aim was to evaluate the immunohistochemical markers in hepatoblastomas and to understand the role of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) which is used for the assessment of reparative/regenerative activity in tumors, and to search the association of this marker with mutant p53 expression which is the most common genetic alteration in neoplasms. We studied cytokeratin (AE1/AE3), α fetoprotein, CEA, vimentin, S-100 protein, chromogranin synaptophysin, PCNA and p53 expressions in formalin fixed paraffin embedded tissue sections of three fetal-embryonal and one epithelial-mesenchymal type hepatoblastoma cases by streptavidin biotin peroxidase technique. Cytokeratin and α -fetoprotein expressions were shown in all cases. PCNA index was between 0.800 and 0.990. Although there are different results in some studies, our results were in accordance with the most of the literature.

Key Words : Hepatoblastoma, immunohistochemistry, proliferating cell nuclear antigen, p53 oncoprotein.

yonel gelişim aşamaları ile oldukça yakın bir paralellik göstermesi dikkat çekicidir^{2,3}. PCNA, DNA polimeraz delta'nın yardımcı proteinidir ve proliferasyon hücrelerinde hücre siklusunun geç G1 ve S fazı boyunca sentez edilir, DNA sentezi için gereklidir ve çeşitli lezyonlarda proliferasyon belirleyicisi olarak kullanılmaktadır^{4,5}. p53 tümör baskılayıcı gen, hücre proliferasyonunun kontrolünde önemli bir rolü olduğu düşünülen bir nükleer fosfoprotein kodlar. Normal şartlar altında bu protein (wild tip), hücrede çok düşük konsantrasyonlarda olması nedeniyle konvensiyonel im-

* Bu çalışma, 19-22 Ekim 1995 tarihleri arasında Bursa'da yapılan XII. Ulusal Patoloji Sempozyumu'nda poster bildiri olarak sunulmuştur.

¹ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD

² Ondokuz Mayıs Üniversitesi Çocuk Cerrahisi ABD

münhistokimyasal yöntemlerle saptanamaz, ancak mütasyona uğramasıyla hücre içi yarı ömrünün uzaması sonucu saptanabilir hale gelir. Son yıllarda bazı malign tümörlerde p53 gen ekspresyonu gösterilmiş, bunun prognostik önem taşıyabileceği ileri sürülmüştür⁷. Ayrıca, p53 ekspresyonu gösteren bazı tümörlerde yüksek PCNA reaktivitesinin bulunabileceği gösterilmiştir¹¹. Bu çalışmamda, kurumumuz arşivlerinde saptanan 4 hepatoblastom olgusunda immunhistokimyasal profil, PCNA indeksi ve p53 tümör baskılayıcı gen ürünü varlığı araştırılmış, elde edilen veriler literatür bilgileri ışığında tartışılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı 1983-1995 yılları arşivlerinde saptanan 4 hepatoblastom olgusunun ve kontrol dokuları olarak seçilen, normal olarak değerlendirilmiş infant dönemi post mortem karaciğer doku örnekleri ile belirleyicilere spesifik pozitif kontrol dokularının %10'luk tamponlu nötral formalinde fikse parafin kesitlerine, sitokeratin (AE1/AE3), α -fetoprotein (A-013-01), CEA (TF3H8-1), vimentin (V9), S-100 protein (15E2E2), kromogranin (LK2H10), sinaptofizin (SY38), (Biogenex, San Ramon, CA, USA); proliferating cell nuclear antigen (PCNA; P10) ve p53 (BP53-12-1) (Zymed, CA, USA) monoclonal, mouse antikorları ile negatif kontrol için siğir fetus serumu immunhistokimyasal yöntemle streptavidin-biotin peroksidaz (Zymed, CA, USA) kiti kullanılarak uygulandı. Hepatoblastoma ve kontrol karaciğer olgularının PCNA indeksi (nükleer pozitivite gösteren hücreler/1000 hücre) hesaplandı. Diğer belirleyici reaksiyonları ile p53 ekspresyonu, reaktif hücrelerin oranlarına göre (%1-%25= (+); %26-50 = ()); %51-75= (+++) ve >%75=(++++)) derecelendirildi.

OLGU SUNUMU

OLGU 1

3/12 yaşında erkek hasta karında aile tarafından tespit edilen kitle nedeniyle başvurdu. Yapılan eksplorasyonda karaciğer sağ lobunu işgal eden, keskin kenarlı, düzgün yüzeyli 12x8 cm boyutlarında kitle tespit edildi. Makroskopik incelemede 12x8x5 cm boyutlarında kitlenin karaciğere kıyasla daha sert bir kıvama sahip olduğu, kesit yüzeyinde ise kalsifiye ve nekrotik odaklar içerdiği dikkati çekti. Işık mikroskopik incelemede; sellüler, stromadan fakir, fetal özellikteki karaciğer hücrelerinin trabeküler yapılar ve solid adalar oluşturmaları ile karakterli tümöral yapı izlendi. Arada osteoid ve kondroid doku komponentleri dikkati çekti. Yapılan immunhistokimyasal çalışmada sitokeratin ve α -FP diffüz boyanma gösterirken CEA, sinaptosin, kromogranin, S-100 protein ve vimentin (mezenkimal komponent de dahil olmak üzere), negatif reaksiyon vermiştir. Tümör hücrelerinin p53 ekspresyon etmedikleri gözlenmiştir. PCNA indeksi 0.845 olarak saptanmıştır. Hasta 1989'dan beri takiptedir.

OLGU 2

14/12 yaşında kız hasta karın sağ yanında fark edilen kitle yakınması ile başvuruyor. Yapılan eksplorasyonda karaciğer sağ lob laterali ile ilişkili, kapsüllü görünümde, düzgün yüzey ve kontürlü kitle tespit edildi. Makroskopik incelemede 7x6x4 cm boyutlarında küpsüllü, düzgün yüzeyli, yumuşak kıvamda kitlenin kesit yüzeyinde küçük kanama odakları içerdiği dikkati çekti. Işık mikroskopik incelemede ağırlıklı olarak fotal özellikteki karaciğer hücrelerinin trabekül ve hücre kordonları oluşturmaları ile karakterli tümöral yapı izlendi. Yapılan immunhistokimyasal çalışmada tümör hücreleri α -FP ve sitokeratin ile diffüz ve güçlü reaksiyon verirken CEA, sinaptofizin, kromogranin, S-100 protein ve vimentin negatif boyanmışlardır. p53 protein ekspresyonu bu tümörde de gösterilmemiştir; PCNA indeksi 0.990 olarak saptanmıştır. Hasta 1990'dan beri takiptedir.

OLGU 3

8/12 yaşında kız hasta karında giderek ilerleyen şişlik yakınması ile başvuruyor, yapılan laparotomide saptanan ve karaciğer bütünü kistik bir kitleye dönüştürerek tüm karın içi organlara yaygın yapışıklıklar gösteren kitleye intraoperatif olarak hepatoblastom tanısı verildi. Yapılan mikroskopik incelemede çevre karaciğer dokusunu basıya uğratmış, geniş nekroz alanlarına sahip fotal ve embriyonal tipte hepatositlerden oluşan tümöral yapı izlenmiştir. Bu olguda PCNA indeksi 0.800 olarak tespit edilirken p53 gen ekspresyonu saptanmamıştır. Vimentin immünreaksiyonu pozitif saptanmış; çalışılan diğer belirleyiciler ilk iki olgudaki sonuçları vermiştir. Hasta ilk kemoterapiyi takiben exitus olmuştur.

OLGU 4

18/12 yaşında kız hasta karın üst kısmında şişlik yakınması ile başvuruyor. Yapılan eksplorasyonda sol lob ön yüzde yerleşmiş, yüzey ve sınırları düzensiz kitle saptanmıştır. Makroskopik incelemede 10x8x4.5 cm boyutlarında, kirli beyaz renkte sert kıvamda tümöral kitle izlendi. Işık mikroskopisinde ağırlıklı olarak fotal ve embriyonal elemanların trabeküler yapılar, yalancı adenoid ve arada yer yer de rozet yapıları oluşturmaları ile karakterli tümöral yapı gözlemlendi. İmmunhistokimyasal panel ve p53 onkogen ekspresyonu diğer olgulara benzer nitelikteydi. PCNA indeksi 0.860 bulunmuştur. Olgu 1994'den beri takiptedir.

Yapılan incelemede, pozitif kontrol kesitlerinde beklenen immunhistokimyasal reaksiyonlar gözlenmiş, negatif kontrol kesitlerinde ise boyanma saptanmamıştır. Olguların tümüne ait klinik, histopatolojik ve immunhistokimyasal bulgular tablo 1 ve 2'de özetlenmiştir.

TARTIŞMA

Hepatoblastomalar çocukluk çağı primer hepatik tümörleri- nin %25'inden fazlasını oluşturular ve %50 oranında da malign davranış gösterirler¹. Olguların %88'i 5 yaş, %68'i 2 yaş altında-

Olgular	Yaş	Cinsiyet	Serum α-FP	Histolojik Alt Tip	Sağkalım
1	3/12	Erkek	Yüksek	Mikst mezarkimal	5 yıl
2	143/12	Kız	Yüksek	Fötal embriyonal	4 yıl
3	8/12	Kız	Yüksek	Fötal embriyonal	Ex
4	18/12	Kız	Yüksek	Fötal embriyonal	1 yıl

Tablo 1 : Olgularımızın klinik ve histopatolojik özellikleri

dır, %5'inde ise eşlik eden durum yada anomali vardır. Bu çalışmada sunulan olguların tümü 2 yaşın altında olup en büyüğü 18 aylık en küçüğü ise 3 aylıktı (ortalama 10.7/12 y.). Olgularımızda başka bir doğumsal anomali saptanmamıştır.

Hepatoblastomalar karaciğerin embriyonal gelişim evreleri ile önemli paralellik gösterirler. Karaciğer; safra kesesi ve bilier duktus sistemleri ile birlikte 4. gebelik haftasında ön barsak döşeyici endodermal epitelinin ventral bölümünden bir tomurcuk olarak gelişir. Prolifere olan endodermal hücreler karaciğer hücre kordonları ve intrahepatik safra kanallıklarının epitelini oluştururken hematopoietik hücreler, Kupffer hücreleri ve destek dokusu, septum transversumun splanknik mezarkiminden gelişir². Bu gelişim paterni ile yakın birliktelik gösteren hepatoblastomalar histopatolojik olarak fötal-epitelyal, embriyonal-fötal, epitelyal, makrotrabeküler, küçük hücreli ve mikst epitelyal-mezarkimal alt tiplere ayrılmaktadır³. Olguların %56'sını epitelyal, %44'ünü mikst alt tipler oluşturur. Bu sınıflama doğrultusunda, olgu serimiz içerisinde yer alan 4 olgudan 3'ü fötal-embriyonal, bir tanesi ise teratoid eleman içermeyen mikst epitelyal-mezarkimal tipti. Bu histolojik ayrım immünofenotipik karakterlerin ortaya konması ile yeni tartışmalara yol açmıştır. İmmünohistokimyasal yöntemler ile değişik antikorlar kullanılarak yapılan pek çok çalışmada hepatoblastomların alt tiplerini sitokeratin, α-FP ve CEA ile değişen oranlarda boyadıkları gösterilmiştir⁴. Tümörün morfolojik olarak mezarkimal olarak nitelenen komponentini oluşturan elemanların özellikle de osteoid benzeri materyalin EMA, sitokeratin ve α-FP eksprese etmesi düşündürücüdür ve morfolojik ayrımın gerçekte aldattığı olduğunun ve bu tümörlerin hepsinin epitelyal kökenli olduklarına bir kanıt oluşturur⁵. Nitekim serimize ait bir mikst tip hepatoblastom olgusunda da varolan osteoid materyal epitelyal belirleyiciler ile pozitif reaksiyon vermiştir. Yapılacak yeni çalışmaların bu konuya açıklık getireceğini umuyoruz. Ruck ve ark. da özellikle mikst tip hepatoblastom olgularında serotonin ve somatostatin reaktif nöroendokrin diferansiyasyon gösteren hücrelerin bulunabileceğine dikkat çekmişlerdir⁶. Biz, kromogranin ve sinaptofizin kullanarak yaptığımız incelemede tümör hücrelerinde bu yönde bir diferansiyasyon saptayamadık.

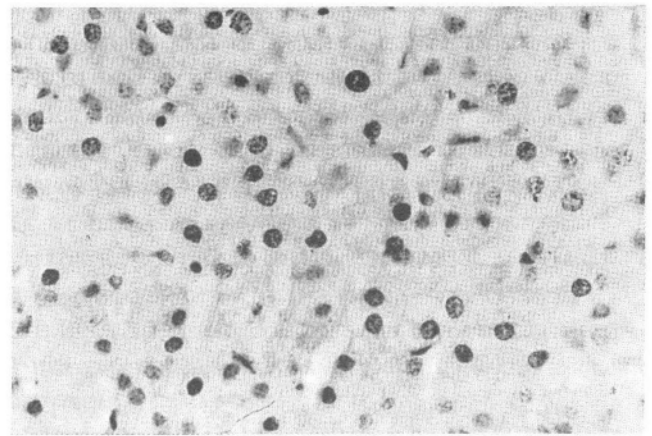
PCNA hem malign potansiyel taşıyan tümörlerin hem de re-

Belirleyiciler ve Olgular	1	2	3	4
α-FP	+++	++	++	++++
Cytokeratin	++	++	++	+++
CEA	-	-	-	-
Vimentin	-	-	+++	-
S-100	-	-	-	-
Kromogranin	-	-	-	-
Sinaptofizin	-	-	-	-
PCNA	0.845	0.990	0.800	0.860
p53	-	-	-	-

Tablo 2 : Olgularımızın immünohistokimyasal inceleme sonuçları

peratif/rejeneratif aktivitenin değerlendirilebilmesine imkan sağlamaktadır. PCNA immünreaksiyonu; hücre replikasyonuna bağlı olarak eksprese edilmesi, DNA onarımı sonucu oluşan PCNA'nin yeniden dağılımı ve/veya PCNA geninin az veya fazla eksprese edilmesine bağlı değişiklikler ya da düzeni bozulan PCNA transkripsiyon veya translasyonu doğrultusunda belirlenir. PCNA mRNA'sını stabilize eden büyüme faktörleri salgılayan tümörlerde DNA sentezi uyarılmadan da PCNA birikimi olabilir⁶. Olgularımıza ait PCNA indeksleri 0.800 ile 0.990 arasında değişmektedir (ortalama 0.877). Kontrol olarak seçilen karaciğer dokuları ile karşılaştırıldığında belirgin yüksekliği dikkati çeken PCNA reaktivitesinin bu tümörlerin yüksek proliferatif aktivitesinin göstergesi olduğuna inanıyoruz. Geniş serilerde yapılacak çalışmalarda bu tümörlerde PCNA indeksinin niteliği daha iyi anlaşılacaktır. En yüksek PCNA indeksi gösteren olgu epitelyal alt tip üyesiydi.

Genotoksik bir stress sonrası p53 geninin bir transkripsiyon faktörü gibi hareket ederek Gadd45 ve p21 gibi efektör genleri



Resim 1 : Bir fötal embriyonal tip hepatoblastom olgumuzda (Olgu 4) PCNA immün reaksiyonu (PCNA indeksi: 0.860; biotin streptavidin peroksidaz, x630, imm.oil).

aktive ettiği ortaya konmuştur. p21 in inhibe olmasıyla PCNA üzerindeki baskılanma ortadan kalkar ve DNA replikasyonu indüklenir ve sonuç olarak yüksek miktarda PCNA birikimi gözlenir. Gadd45 ise DNA tamirini indükleyerek, hasarlı DNA bölgelerinde PCNA'in yeniden dağılımını sağlar ve bu da yüksek PCNA ekspresyonu görülmesine yol açabilir¹⁰. p53 geni delesyon ve/veya mutasyonu, erişkinlerde görülen çeşitli tümörlerde özellikle karsinomlarda sıklıkla saptanmasına karşın çocukluk çağında görülen tümörlerde daha az izlenmektedir. Kar ve ark., yaptıkları çalışmada 47 hepatosellüler karsinom olgusunun hiç-

birinde mutant p53 tümör baskılayıcı gen proteinini saptayamamış, 3 hepatoblastom olgusundan birinde ise bu gen ürününün varlığını göstermişlerdir^{7,11}. Tarafımızdan kullanılan p53 protein antikor klonu hem "wild" hem de "mütant" form p53 proteine spesifisite göstermektedir. Serimizde, p53 tümör baskılayıcı gen ürünü olgularımızdan hiçbirinde gösterilememiştir. Bu sonuç, kanımızca bu tümörlerin patogenezinde herhangi bir aşamada p53 mutasyonunun olmayabileceğini, saptanan yüksek PCNA varlıklarının da diğer mekanizmalar ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Stocker JT. Hepatic tumors in children, in Suchy FJ: Liver disease in children, St. Louis, 1994, 901-926.
2. Larsen VJ. Human Embryology, New York, Churchill Livingstone, 1993, 210-214.
3. Conran RM., Hitchcock CL., Waclawiw MA et al. Hepatoblastoma: The prognostic significance of histologic type. *Ped Pathol* 1992; 12: 167-183.
4. Hall PA., Levison DA., Woods AL., et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalisation in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of de-regulated expression in some neoplasm. *J Pathol* 1990; 162: 285-294.
5. Geary WA., Cooper PH. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in common epidermal lesions. *J Cutan Pathol* 1992; 19: 458-468.
6. Woosley JT., Dietrich DR. Prognostic significance of PCNA grade in malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 1993; 20: 498-503.
7. Kar S., Jaffe R., Carr B. Mutation at codon 249 of p53 gene in a human hepatoblastoma. *Hepatology* 1993; 18: 566-569.
8. Abenoza P., Manivel JC., Wick MR. Hepatoblastoma: An immunohistochemical and ultrastructural study. *Hum Pathol* 1982; 18: 1025-1032.
9. Ruck P., Harms D., Kaiserling E. Neuroendocrine differentiation in hepatoblastoma: An immunohistochemical investigation. *Am J Surg Pathol* 1990; 14: 847-855.
10. Smith ML., Chen I.T. Zhan Q. et al. interaction of the p53-regulated protein Gadd 45 with proliferating cell nuclear antigen, *Science* 1994; 266: 1376-1379.
11. Chang F., Syrjwanen S., Kurvinen K., Syrjwanen K. The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 174-186.