

SİGARA İÇEN VE İÇMEYEN BİREYLERE AİT DİŞETİ ÖRNEKLERİNDE p16 TÜMÖR SUPRESÖR GEN EKSPRESYONU

Yrd. Doç. Dr. S. Elif GÜLTEKİN*

Dt. Burcu SENGÜVEN*

Dt. Burcu KARADUMAN**

ÖZET

Oral kanserin de dahil olduğu birçok kanser gelişiminde, p16 tümör supresör geninin inaktivasyonunun rol aldığı belirtilmektedir. Günümüzde p16'nın özellikle sigara içen bireylerde, premalign veya malign neoplazilerin erken tanısında kullanılabilecek önemli bir biyomarker olabileceği düşünülmektedir. Sigara, oral kanser gelişimindeki en büyük risk faktörlerinden biri olduğuna göre sigara içen bireylerin dişetinde p16 inaktivasyonu saptanması, oral kavitede gelişebilecek olası bir malign veya premalign lezyonun erken teşhisinde yararlı olabilir. Bu düşünceden yola çıkarak, sigara içen ve içmeyen toplam 40 adet gönüllü bireyden, mandibular posterior bölge yapışık dişetinden alınan örnekler immünohistokimyasal olarak p16 antikoruna ile boyandı. Işık mikroskopunda değerlendirilen ve nükleer/stoplazmik, kuvvetli kırmızı boyanan hücreler, p16 proteinini ekspresyon eden pozitif hücreler olarak kabul edildi. Toplam örneklerin %25'inde p16 over ekspresyonu gözlemlendi. Sigara içen grupta p16 ekspresyonu daha fazla bulundu (%60'ı sigara içenlerde, %40'ı sigara içmeyenlerde). Ayrıca ileri yaşlarda ve erkeklerde p16 antikorunun immünreaktivitesi daha yüksek saptandı. Ancak istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık izlenemedi.

Anahtar kelimeler: sigara, oral mukoza, p16 tümör supresör gen.

GİRİŞ

İnsanda görülen belli başlı kanser türleri içerisinde yer alan oral kanserin etkeni tam olarak

EXPRESSION OF p16 TUMOR SUPPRESSOR GENE IN THE GINGIVAL SAMPLES OF SMOKERS AND NON-SMOKERS

ABSTRACT

The tumor suppressor gene, p16 is a cell cycle regulator that is frequently inactivated in many different types of malignancies. It was reported that p16 may be a valuable biomarker for identification of elevated risk of cancer in smokers. The aim of present study was to investigate the possible role of p16 as a biomarker by evaluating the expression of p16 in gingival epithelium of smokers and non-smokers. From smoker and non-smoker volunteers, 40 gingival biopsies were obtained from the mandibular molar attached gingiva. Gingival samples were stained with p16 antibody by immunohistochemistry. Histopathological evaluation was done by light microscopy. The epithelial cells that showed red nuclear/cytoplasmic staining were accepted as positive. P16 gene expression in smokers was higher (%60 in smokers, %40 in nonsmokers). The immunoreactivity of p16 antibody was higher in males and older ages. Nevertheless, differences were not statistically significant.

Key words: smoking, oral mucosa, p16 tumor suppressor gene.

açıklığa kavuşturulamamıştır. Ancak sigara ve tütün başta olmak üzere alkol, güneş ışını (alt dudakta gelişenler için), kronik irritanlar, sifiliz, beslenme bozuklukları ve virüsler risk faktörleri

* Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Oral Patoloji Bilim Dalı

** Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Ana Bilim Dalı

arasında sayılmaktadır.¹⁻³ Bu nedenle oral kanserin oluşum mekanizması bir çok etyolojik faktöre bağlı, çok basamaklı bir süreç olarak tarif edilmektedir.⁴

Kanserin ortaya çıkış mekanizmasında, hücre büyümesini kontrol eden genlerdeki hasarın büyük rol oynadığı kabul edilmektedir. Bu genlerden en çok üzerinde durulanlar arasında p16 tümör süpresör geni de bulunmaktadır. P16/INK4A, 9p21 kromozom bölgesinde bulunur ve siklin bağımlı kinaz 4/siklin D kompleksini inhibe eden p16 proteini kodlar. Siklin bağımlı kinaz 4/siklin D kompleksi ise, hücrenin G1 fazından S fazına geçişinde gerekli olan retinoblastom proteininin (pRb) fosforlaştırılmasını düzenler. p16 geni mutant veya inaktif halde ise, siklin bağımlı kinaz 4/siklin D kompleksininin aktivitesini bloke etme kapasitesini kaybeder. Böylelikle de pRb hücre siklusu boyunca fosforile kalır ve bunun sonucu olarak hücrenin S fazına geçip, çoğalmasına neden olur.⁵

Oral kanser ve oral premalign lezyonlar da dahil olmak üzere birçok farklı tümör ve premalign lezyonda p16 inaktivasyonu gösterilmiştir. P16 inaktivasyonun mutasyon, homozigot silinme veya metilasyon sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir.⁶⁻⁷ Sigara içen bireylerde, gerek akciğerdeki preneoplastik epitelyal lezyonlarda, gerekse akciğer kanserinde bronş epitel hücrelerinde ve tükürük örneklerinde p16 metilasyonu gösterilmiştir.⁸⁻¹⁰ Günümüzde p16'nın özellikle sigara içen bireylerde, akciğer kanserinin ve buna bağlı gelişen lezyonların erken tanısında kullanılabilecek önemli bir biyomarker olabileceği düşünülmektedir.^{9,10}

Cespedes ve arkadaşları sigara içen bireylerde daha fazla oranda alleni kayıp tespit etmişler ve bunu da sigaranın uzun süreli kullanımı so-

nucu gelişen kromozom instabilitesine bağlamışlardır. Sigara içindeki benzo[*a*]pyrene-diolepoxide (BPDE) gibi spesifik karsinojenlerin DNA'nın çift sarmal yapısında hasara neden olduğu ve kırılmalar meydana getirdiği gösterilmiştir.¹¹

Oral kanser, Dünya Sağlık Örgütü'nün tespit ettiği en ölümcül sekiz kanser türü içerisinde yer almaktadır. Sigara, oral kanser gelişimindeki en büyük risk faktörlerinden biri olduğuna göre,¹² sigara içen bireylerin oral mukoza veya dişetinde p16 inaktivasyonu saptanması, oral kavitede gelişebilecek olası bir malign veya premalign lezyonun da erken teşhisinde yararlı olabilir.

Bu görüşten yola çıkarak, sigara içen ve içmeyen bireylerin dişeti epitelindeki p16 protein ekspresyonunu karşılaştırılarak, p16'nın bir biyomarker olarak olası rolünü değerlendirilmeye çalışmak araştırmamızın amacını oluşturmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'ne periodontal tedavi amacı ile başvurmuş toplam 40 adet gönüllü bireyden alınan biyopsi örnekleri üzerinde G. Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Oral Patoloji Bilim Dalında yürütüldü. Çalışma grupları, sigara içen ve içmeyen olmak üzere iki gruba ayrıldı. Son beş yıldır günde en az 10 adet sigara içen 20 birey sigara içen, sigara içmeyen ve hiç sigara kullanmamış 20 birey ise sigara içmeyen grubu oluşturdu. Bireylerin hiçbirisinde herhangi bir sistemik hastalık veya sürekli ilaç kullanımı bulunmamaktaydı. Hastaların yaş, cinsiyet gibi özellikleri ve bir günde içtikleri sigara sayısı not edilerek, yapılan periodontal tedaviler sırasında mandibular posterior bölge yapışık dişetinden 0,5 cm boyutlarında alınan biyopsiler

%10'luk formül içinde değerlendirilmek üzere Oral Patoloji Bilim Dalı'na gönderildi.

İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

Parafin bloklardan 5µ kalınlığında polilizinli camlara alınan kesitlere streptavidin-biyotin 3'lü indirekt immünperoksidaz yöntemi kullanılarak immünohistokimyasal boyama yapıldı. Kullanılan primer antikor kullanıma hazır , IgG1 türünde ve monoklonaldı. Sekonder antikor ve streptavidin kompleksi (Polyvelant streptavidin detection system, Ncomarkers, CAT NO:TP-015-HA Labvision Co, Ca, USA) ve görüntüleme için kullanılan kromojen peroksidaz işaretli Aminoethyl Carbazole (AEC (red) Zymed Lot No:11067520 San Francisco, USA) ticari olarak kullanıma hazır kitler şeklindeydi.

Kesitler 56°C derecelik etüvde 12 saat süre ile bırakıldı ve ksitolde 30 dakika bekletildikten sonra, 15 dakika süre ile %96'luk etil alkolden geçirilerek deparafinize ve dehidrate edildi. Çeşme suyunda ve sonrasında distile suda yıkanan kesitler antijen retrieval solüsyonu (0.01M sitrat buffer, pH:6.0) ile mikrodalga fırında 15 dakika muamele edildi. Oda ısısında 30 dakika bekletildikten sonra %3'lük H₂O₂ ile 10 dakika endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Kesitler fosfat buffer salinc (PBS, pH:7.6) solüsyonu ile yıkandı ve spesifik olmayan boyamaları bloke etmek için Ultra V blokta 5 dakika bekletildi. Primer antikor p16INK4a Ab-4 (Clone 16P04/JC2), (Ncomarkers Cat #MS-887-R1 mouse monoclonal antibody, Labvision Co, Ca, USA) kesitleri kapatacak şekilde uygulanarak 2 saat süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında sırasıyla sekonder (bağlayıcı) antikor ve Streptavidin biyotin kompleksi 10'ar dakika ile uygulandı ve kesitler PBS solüsyonu ile yıkandı. Görüntülemeyi

sağlamak amacı ile AEC (Aminoethyl Carbazole) 20 dakika süre ile uygulandı ve distile su ile yıkandı. Zemin boyaması Mayer's hematoksilen ile yapıldı, distile su ile yıkandıktan sonra kesitler su bazlı kapatma balzamu ile kapatıldı.

Pozitif doku kontrolü olarak rektum adenokarsinom kullanıldı.

Değerlendirme ışık mikroskopunda x100 büyütmede, her iki gruba ait kesitlerde epitel içerisinde p16 pozitif hücre varlığının tespiti ile gerçekleştirildi. Epitelde p16 antikoruna ile pozitif boyama gösteren hücreler şu şekilde skorlanmıştır. Epitel hücrelerinde hiçbir boyanma olmaması (-), epitel hücrelerinin %1-5'inde boyanma olması (+), epitel hücrelerinin %5-50'sinde boyanma olması (++) ve epitel hücrelerinin %50'sinden fazlasında boyanma olması (+++) olarak değerlendirilmiştir.

İstatistiksel analizler "SSSP for Windows ver. 9.0.0" program ile yapıldı ve gruplar arasındaki farklılıklar bağımsız gruplar için Student t testi ve Fisher kesin ki-kare testi gibi değişkenlerin türüne göre seçilmiş uygun parametrik ve nonparametrik testlerle; p16 ekspresyonu ile yaş, cinsiyet, sigara kullanımı arasındaki korelasyon ise Pearson ki-kare testi ve lojistik regresyon analizi ile yapıldı.

BULGULAR

Klinik Bulgular

Çalışmaya dahil edilen toplam 40 bireyin yaş ve cinsiyet dağılımı Tablo I'de yer almaktadır. Sigara içen ve içmeyen grupların yaş ortalaması sırası ile 42.55±11.12 (25-71) ve 41.25±10.84 (18-61) olup gruplar arasında bir farklılık izlenmemiştir. Sigara içen grupta erkek bireylerin sayısı baskın iken (%65), sigara içmeyen gruptaki

kadın erkek sayıları hemen hemen birbirine eşittir (%45-%55).

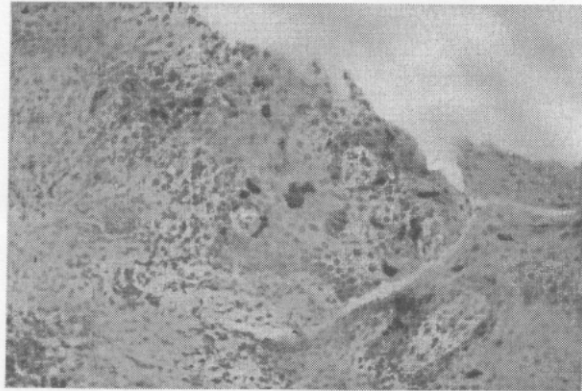
Tablo I: Sigara içen ve içmeyen vakalara ait klinik veriler ve p16 immünreaktivitesi

Vaka	Sigara İçen (n:20)			Sigara İçmeyen (n:20)		
	Yaş	Cinsiyet	p16	Yaş	Cinsiyet	p16
1	28	K	+	50	E	-
2	40	E	-	34	E	-
3	45	E	++	37	E	+
4	63	E	-	24	E	-
5	40	E	+	18	K	-
6	40	E	+++	31	E	-
7	40	K	-	41	K	-
8	42	E	+	46	E	-
9	38	E	+	57	E	-
10	38	K	-	61	E	-
11	25	K	-	35	E	-
12	40	E	-	37	K	-
13	46	K	-	50	E	-
14	31	K	-	32	K	+
15	52	E	-	46	K	-
16	35	K	-	40	K	-
17	38	E	-	41	K	+
18	71	E	-	50	K	+++
19	57	E	-	54	K	-
20	42	E	-	41	E	-

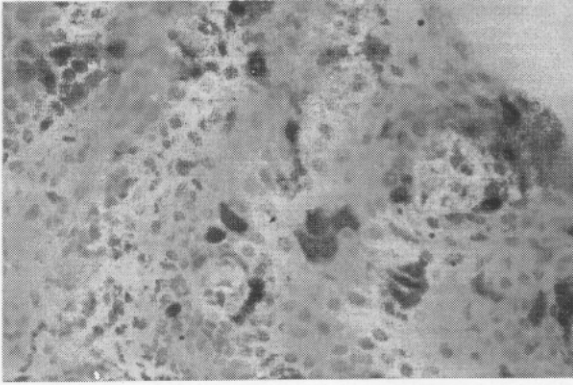
Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Bulguları

Sigara içen ve içmeyen gruplara ait biyopsi örneklerinde epitelde akantozis, hiperkeratozis, retelerde proliferasyon izlenmiş olup hücresel atipi görülmemiştir. Bağ dokusunun fibroselüler karakterde olduğu ve hafif düzeyde, lenfositden zengin inflamatuvar hücre infiltrasyonu içerdiği izlenmiştir. Klinik olarak periodontitisli vakalara ait kesitlerde ise plazma hücresinden zengin bir infiltrat mevcuttur. Sigara içen gruba ait kesitlerde, sigara içmeyen gruba ek olarak hiperkeratinizasyon ve irregüler rete formasyonun daha belirgin olduğu dikkati çekmiştir.

Çalışmamızda, immünohistokimyasal boyama sonucunda ışık mikroskopunda değerlendirilen ve x100'lük büyütmede nükleer/stoplazmik, kuvvetli kırmızı boyanan hücreler, p16 proteini eksprese eden pozitif hücreler olarak kabul edilmiştir. Boyanma patterni ve dansitesi açısından sigara içen ve içmeyen grup arasında bir farklılık izlenmemiştir. P16 pozitif hücreler genelde bazal tabakada izlenseler de, spinoz tabakada ve tek bir vakada tüm tabakalarda lokalize oldukları izlenmiştir (Resim 1, 2).



Resim 1. Dişeti skuamöz epitelinin tüm tabakalarında kuvvetli p16 ekspresyonu gösteren, pozitif hücreler (ABC, x 200).



Resim 2. P16 antikoruna ile belirgin nükleer/stoplazmik kırmızı boyanmış keratinositler (ABC, x 400).

Sigara içen ve içmeyen toplam 40 vakaya ait örneklerin %25'inde (10/40) p16 immünreaktivitesi gözlenmiştir. P16 pozitifliği görülen vakaların %60'ı (6/10) sigara içen, %40'ı (4/10) içmeyen gruba aitti, her iki grup arasında p16 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak bir farklılık görülmedi (Tablo II). Sigara içen gruba ait örneklerin %30'unda (6/20), sigara içmeyen grup örneklerinin ise %20'sinde (4/20) p16 antikoruna ile pozitif boyanma görüldü ancak her iki grup arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi. p16 pozitif vakalardaki, pozitif hücre skorlaması tablo 3'te verilmiştir (Tablo III). P16 pozitifliği gösteren vakaların %70'inde epitel hücrelerinin %1-5'inde p16 immünreaktivitesi görülürken, vakaların sadece %20'sinde epitel hücrelerinin %50'sinden fazlasında p16 antikoruna ile boyanma izlenmiştir. P16 boyanma skorları açısından sigara içen ve içmeyen grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Toplam 10 adet p16 pozitif vakanın altısı erkek, dördü kadın hastalara aittir. Pozitif olarak değerlendirilen vakaların 5'i (%50) beşinci dekadadır.

Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon ve p16 reaktivitesi ile cinsiyet ya da yaş arasında anlamlı sonuçlar bulunmamıştır.

Tablo II: p16 pozitif ve negatif vakalar

Toplam vaka (n: 40)	Sigara İçen (n: 20)	Sigara İçmeyen (n: 20)
p16 (+) (n: 10)	6	4
P16 (-) (n:30)	14	16

Tablo III: p16 pozitif hücre skorları

P16 (+) Hücre Sayısı (n: 10)	P16 (+) (n: 7)	P16 (++) (n: 1)	P16 (+++) (n: 2)
Sigara içen (n: 6)	4	1	1
Sigara içmeyen (n: 4)	3	0	1

TARTIŞMA

Sigaranın etyolojik faktör olarak rol oynadığı, oral kanserin de dahil olduğu birçok kanser gelişiminde, p16 tümör supresör geninin inaktivasyonunun etkin olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmektedir. Özellikle akciğer kanserinin erken teşhisinde bronş epitel veya tükürük gibi kolay

elde edilebilir örneklerde p16 inaktivasyonunun saptanabilmesi önemli bir biyomarker olabileceğini düşündürmektedir.⁹

Baş boyun bölgesinin skuamöz hücreli karsinomlarının %70-80'inde p16 gen bölgesinde homozigot kaybı gösterilmiş ve p16 geni inaktivasyonunun skuamöz hücreli karsinom gelişiminde oldukça önemli rol oynadığı belirtilmiştir.¹³

Çalışmamızda, toplam 40 vakanın %25'inde p16 over ekspresyonu saptanmıştır. Bu pozitif örneklerin de %60'ı sigara içen, %40'ı sigara içmeyen bireylere aittir, sigara içen bireylerin %30'u p16 pozitifdir. P16 tümör supresör geni ile ilgili çalışmalar genellikle gen kaybı, gen inaktivasyonu veya metilasyonu ile ilgidir. Sadece immünohistokimyasal yöntemlerle yapılan sınırlı çalışmalar içerisinde, Haas ve arkadaşları birkaç tümör supresör gen ekspresyonunu araştırdıkları çalışmalarında örneklerin %16'sında p16 pozitifliği izlemiş ve sigara içen bireylerdeki p16 pozitifliği daha düşük (%12.5) bulunmuştur.¹⁴ Bu farklılıklar, kısmen farklı immünohistokimyasal yöntemlerden, kısmen kullanılan antikoların farklı klonlara ait olmasından, kısmen ise biyopsilerin alındığı lokalizasyonların farklılıklarından kaynaklanabilir.

P16 inaktivasyonunun, karsinogenezin en erken evrelerinde dahi saptanabildiği bilinmektedir. Hem akciğerde hem oral mukozada premalign lezyonlarda p16 tümör supresör gen hasarı gösterilmiştir.^{7,10} İmmünohistokimyasal yöntemlerle gösterilen p16 over ekspresyonunun, p16 gen inaktivasyonunu ifade edip etmediği tartışmalıdır. P16 over ekspresyonunun, malign transformasyon öncesi izlendiği, p16 gen inaktivasyonunun gerçekleşmesi ile de premalign ve malign safhaya geçildiği düşünülebilir.

Çalışmamızda p16 pozitif sigara içen bireylerin %66'sı 5. dekattadır. Birçok çalışmada, gen hasarlarının ve neticesinde kanser gelişiminin yaş ile ilişkili bir olay olduğunu ve kanser riskinin yaş ile arttığını vurgulanmaktadır.^{15,16} Sigara içen bireylerde de, yaşla birlikte gen hasarının artmasının sigaranın yol açtığı zararlı etkilerin zaman içinde birikmesinin neden olduğu düşünülebilir.

Bu çalışmada, p16 pozitif vakaların %60'ı erkek, %40'ı kadındır. P16 ekspresyonu ile sigara içimi arasındaki bu ilişkinin sigara içen gruptaki hastalar arasında da erkek sayısının baskın olması (%65) ile yani erkeklerin daha çok oranda sigara kullanmaları ile açıklanabileceği düşünülebilir.

Elde ettiğimiz bulgular, p16 over ekspresyonunun oral bölgede, oral kanser için en önemli etyolojik faktör olarak bilinen sigara içimi ile ve yaşla birlikte arttığını, erkeklerde daha sık izlendiğini göstermektedir. Vaka sayımızın az olması istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşmamızı güçleştirmiş, oral kanserlerde öncü marker olarak kullanılması yönündeki etkilerini net bir şekilde ortaya koyulamamıştır. Ancak çalışmamızın gelecekte, özellikle daha hassas moleküler yöntemlerle yapılacak, daha geniş çalışmalara yol göstereceği inancındayız.

KAYNAKLAR

1. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of literature and a recommended system malignancy grading in oral squamous cell carcinoma. *J. Dental Res* 1987; 95: 229-49.
2. Bishop Jm. *Molecular Themes in Oncogenesis*. *Cell* 1991; 64: 235-48.

3. Bloth WJ, Devesa SS, Mc Laughlin J, Frauman Jr. JF. Oral and pharyngeal cancers. *Cancer Surveys* 1994; 19/20: 23-24.
4. Boring CC, Squires TS, Tong T, Montgomery S. Cancer statistics 1994. *CA Cancer J. Clin* 1994; 44: 7-29.
5. Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K et al. Frequency of homozygous deletion at p16/cdkn2 in primary human tumors. *Nat. Genet.* 1995; 11:211-12.
6. Merlo A, Herman JG Mao L. et al. 5i CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MFS1 in human cancers. *Nature Med.* 1995; 1: 686-92.
7. Papadmptrakopoulou V, Izzo J, Lippman SM. et al. Frequent inactivation of p16 in oral premalignant lesions. *Oncogene* 1997; 14: 1799-1803.
8. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA. et al. Aberrant methylation of p16 (INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11891-6.
9. Belinsky SA, Palmisano WA, Gilliland FD. et al. Aberrant promoter methylation in bronchial epithelium and sputum from current and former smokers. *Cancer Res* 2002; 62: 2370-7.
10. Jarmalaite S, Kannio A, Anttila S. Et al. Aberrant p16 promoter methylation in smokers and former smokers with nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* 2003; 106: 913-918.
11. Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, Takahashi N, Shimazaki Y, Motoyama T. Frequent epigenetic silencing of the p16 gene in non-small cell lung cancers of tobacco smokers. *Jpn J Cancer Res* 2002 Oct; 93(10): 1107-13.
12. Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK. *Oral Pathology. Clinical Pathologic Correlations.* 4th ed. Saunders Elsevier Science 200, 52-55.
13. Akanuma D, Uzana N, Yoshida MA, Negishi A, Amagasa T, Ikeuchi T. Inactivation patterns of the p16 gene in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol* 1999 Sep; 35(5): 476-83.
14. Haas S, Hormann K, Bosch FX. Expression of cell cycle proteins in head and neck cancer correlates with tumor site rather than tobacco use. *Oral Oncol* 2002 Sep ; 38(6) : 618-23.
15. Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NH, Baylin SB. Methylation of the estrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet* 1994 Aug; 7(4): 536-40.
16. Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JP. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res* 1998 Dec 1; 58(23): 5489-94.

Adres:

Dt. Burcu Sengüven

Gazi Üniversitesi

Dış Hekimliği Fakültesi

Oral Patoloji Bilim Dalı

8. Cadde 82. Sokak 06510

Emek-Ankara

Telefon: 0 312 2126220/361

Faks: 0 312 2239226

E-posta Adresi: bsenguven@hotmail.com