

OKÜLER YASSI HÜCRELİ KARSİNOMDA p53 PROTEİNİNİN IMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK BELİRLENMESİ

Fatma Sayın¹

Nursal Metin¹@

S.Serap Birincioğlu¹

Immunohistochemical Detection of p53 Protein in The Ocular Squamous Cell Carcinoma

Özet: Bu çalışmada p53 protein birikimi, bir at ve iki sığırdan alınan, 3 oküler yassı hücreli karsinom olayında, immunohistokimyasal (Avidin-Biotin immunperoksidaz Complex-ABC) yöntemle anti-human p53 protein mouse monoklonal antikoları kullanılarak araştırıldı. Sadece atta p53 pozitif çekirdek boyanması tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Oküler Yassı Hücreli Karsinom, p53, Sığır, At

Summary: The expression of p53 protein was investigated in three ocular squamous cell carcinomas of one horse and two cows by an immunohistochemical (Avidin-Biotin immunperoksidaz Complex-ABC) procedure using anti-human p53 protein mouse monoclonal antibodies. Positive p53 nuclear immunostaining was detected in only equine case.

Key Words: Ocular Squamous Cell Carcinoma, p53, Cattle, Horse

Giriş

Oküler yassı hücreli karsinomlar daha çok sığırlarda, az olarak da at, koyun, kedi ve köpeklerde görülür. Sığır ve atlarda ortalama 7-8 yaşlarında, diğer hayvan türlerinde ise erişkin ya da daha ileri yaşlarda rastlanırlar. Çoğunlukla limbus, palpebra nictitans ve göz kapağında yerleşirler (Cordy,1978; Gelatt, 1991;Wilcock, 1993; Jones ve ark., 1997). İrk ya da cins predileksiyonunun olmadığı bildirilmekle beraber (Cordy, 1978), sığırlarda genetik, viral ve kimyasal faktörler ile radyasyon, güneş ışığı ve insektisitler gibi iritasyonların rol oynadığı bildirilmiş ve özellikle Hereford ırkı sığırlarda göz çevresindeki pigmentasyon yetersizliği neden olarak gösterilmiştir (Cordy,1978; Gelatt, 91; Brash ve ark.,1991; Campbell ve ark., 1993; Kanjila ve ark., 1993). Buzağı ve kedilerde ise güneş ışığına aşırı maruz kalınması ile ilgili olduğu ileri sürülmüştür (Wilcock, 1993).

İmmunohistokimyasal, moleküler ve sitogenetik metotlarla tespit edilebilen p53 gen değişiklikleri, en yaygın olarak insan karsinomlarındaki genetik anormalliklerde görülmektedir (Field ve ark., 1991; Levine ve ark., 1991; Taylor ve Cote, 1994). Son yıllarda yapılan birçok çalışmada, p53 tümör baskılayıcı geni mutasyonlarının, insanların güneş ışığı ile ilgili deri karsinomlarının gelişiminde ve farelerin ultraviyole ışığı ile ilgili yassı hücreli karsinomlarında etkili olduğu ortaya konulmuştur (Pierceall ve ark., 1991; Shen ve ark., 2002). Evcil hayvanlarda ise bu konu ile ilgili oldukça

az sayıda çalışma bulunmaktadır (Ruggeri ve ark., 1991; Teifke ve Löhr, 1996; Sironi ve ark., 1999). Yapılan literatür taramasına göre ülkemizde oküler yassı hücreli karsinom ile ilgili olarak, at (Özbilgin ve ark.,1991) ve koyunda (Çiftçi ve ark., 1996) sadece birer çalışma bulunduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, at ve sığırların oküler yassı hücreli karsinomlarında p53 proteininin immunohistokimyasal olarak saptanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmanın materyalini Cerrahi Anabilim Dalı tarafından operasyonla alındığı bildirilen ve Patoloji Anabilim Dalı'na gönderilen birisi Haflinger ırkı bir kısrağa (I.olgu 12 yaşlı), diğer ikisi Holstayn ırkı iki ineğe ait (II. olgu 10 yaşlı; III. olgu ise 6 yaşlı) üç adet oküler yassı hücreli karsinom olgusu oluşturdu.

Tümörlerden alınan doku örnekleri %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edilerek parafinde bloklandı. Her blokdan 4-6 m kalınlığında alınan kesitlerin bir kısmı rutin olarak hematoksilin-eosin ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Rutin incelemede oküler yassı hücreli karsinom tanısı konulduktan sonra, immunohistokimyasal inceleme için adhesivli lamalar üzerine kesitler alınarak ABC yöntemi ile boyandı (Pressnell ve Schreiberman, 1997). Bu amaçla kesitler deparafinize ve dehidre edilerek, phosphate buffer solution (PBS) ile yıkandı. Dokuda endojen peroksidaz aktivitesini azaltmak için kesitler, % 3' lük H₂O₂'de oda sıcaklığında beş dakika bekletildikten

sonra, PBS ile üç kez beşer dakika yıkanıp, normal keçi serumu ile nemli kamarada 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu işlemlerden sonra, nemli kamaraya alınan kesitlerin üzerine anti p53 hiperimmün serumundan birer damla damlatılıp 30 dakika inkübe edildi ve PBS içinde beş dakika yıkandı. Yıkanan kesitler önce polivalan sekonder antikor sonra da streptavidin-peroksidaz ile otuzar dakika muamele edildi. Her işlem sonunda beşer dakika PBS içinde tutulduktan sonra kromojen solüsyonunda (konsantre bufer solüsyonu, %3'lük H₂O₂, konsantre 3-amino-9-etil karbazol-AEC) 15 dakika bekletildi. Mayer'in hematoksilen boyasıyla bir-iki dakika boyanıp çeşme suyunda mavileşinceye kadar bekletilip, üzerlerine yapıştırmacı damlatılarak lamelle kapatıldı. Her blokta hazırlanan kontrol kesitleri de aynı işleme tabii tutuldu, ancak serum yerine sadece PBS damlatıldı ve tüm kesitler ışık mikroskobunda değerlendirildi.

Bulgular

Makroskobik Bulgular

Alt göz kapağından alındığı bildirilen I. olgu 1.5 x 1.5 x 0.4 cm boyutlarında, korneadan alındığı bildirilen ve korneayı tamamen kaplayan II. olgu 3 x 2.6 x 0.6 cm boyutlarında ve limbustan alındığı bildirilen III olgu ise 2 x 1.7 x 0.5 cm boyutlarında idi. Her üç olguda tümör kitlelerin dış yüzlerinin kabarık, karnıbahar görünümünde, yer yer ülserli, kanamalı ve kesit yüzlerinin boz beyaz renkte olduğu gözlemlendi.

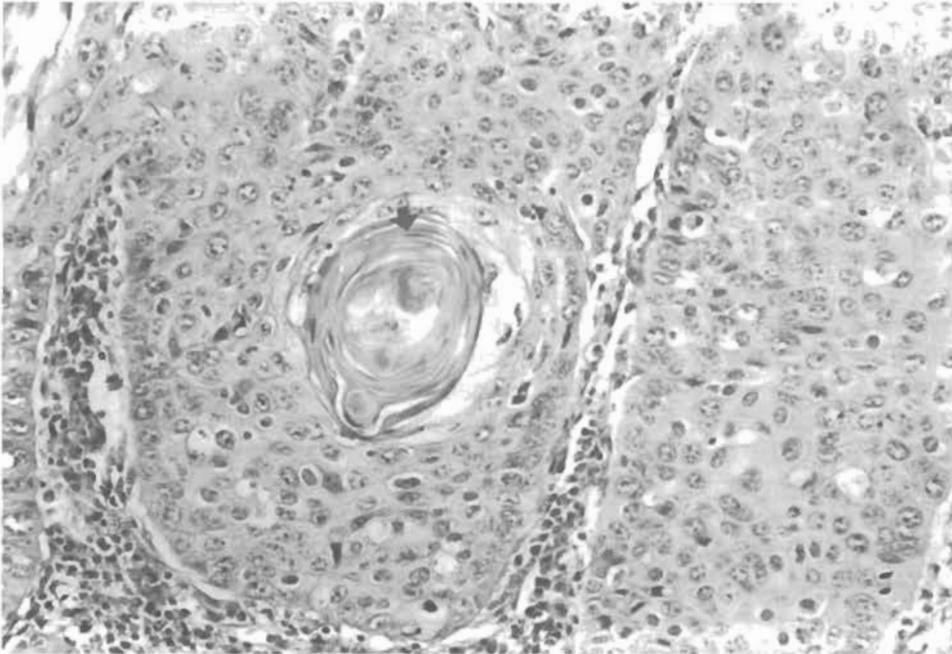
Mikroskobik bulgular

I. olgu: Tümör dokusunun, adacıklar ya da kordlar oluşturan ve sınırları tam olarak seçilemeyen, eosinofilik sitoplazmalı tümör hücrelerinden oluştuğu dikkati çekti. Çekirdeklerin genellikle veziküler, bazı alanlarda ise hiperkromatik oldukları tespit edildi. Belirgin anizonükleozis ile birlikte az sayıda mitoz belirlendi. Glob korne oluşumuna rastlanmadı, ancak tek hücre keratinizasyonları dikkat çekiciydi. Ayrıca bazı tümör adacıklarının merkezinde içinde kromatin parçacıklarının da bulunduğu nekrotik alanlar mevcuttu. Tümör interstisyumunda yoğun mononükleer hücre infiltrasyonu gözlemlendi.

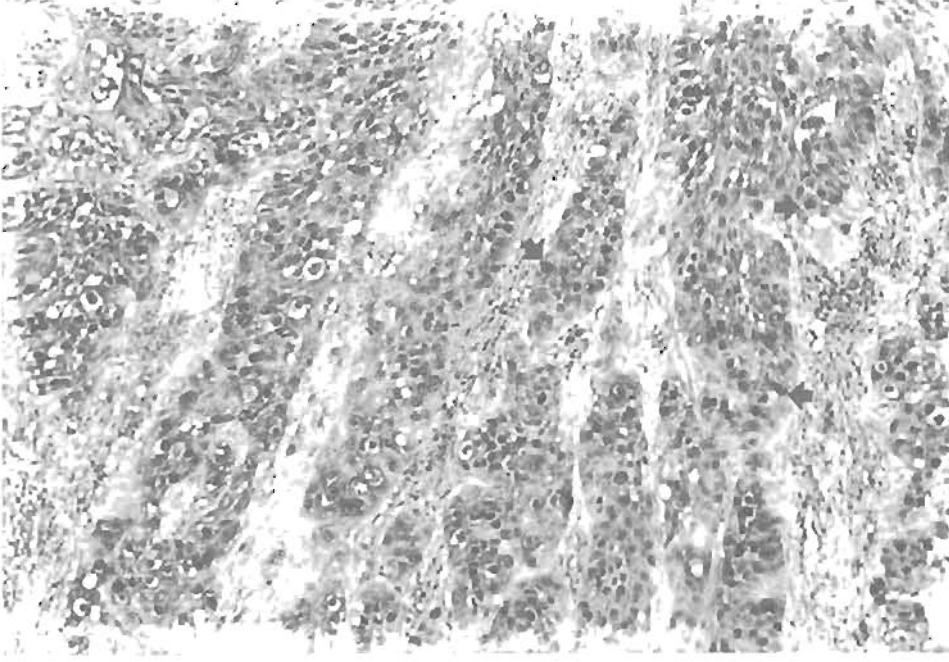
II. olgu: Bu olguda da I. olguda olduğu gibi tümör hücrelerinin adacıklar oluşturduğu ve hücre çekirdeklerinin de yapılarının I. olgu ile benzer özellikte olduğu saptandı. Ayrıca adacıkların merkezinde çok sayıda lamelli keratinizasyon gösteren tipik glob komelerin (kanseri incisi) bulunduğu dikkati çekti (şekil 1).

III. olgu: I. ve II. olguda gözlenen tümör adacıkları bu olguda belirgin değildi. Mitotik figürlerin yoğun, tümör hücrelerinin ise genellikle indifferansiye küçük ve hiperkromatik oldukları tespit edildi. Daha az sayıda differansiye veziküler çekirdekli hücrelere de rastlandı. Tek hücre keratinizasyonları dikkati çekmekle birlikte glob komeler şekillenmemişti.

İmmunohistokimyasal incelemede sadece ata ait I. olguda pozitif sonuç alındı. Tümör hücrelerinin çekirdeklerinin tamamı değişik yoğunlukta boyandı (şekil 2). Boyanma diffuz yayılım göstermekteydi, sadece tek hücre keratinizasyonu ve bazı tümör adacıklarının mer-



Şekil 1. Lamelli keratinizasyon gösteren tipik glob kome (ok), II. olgu. HE, X240



Şekil 2. Tümör adacıklarında p53 pozitif çekirdek boyanması (oklar). Immunperoksidad boyama , X120

kezinde bulunan nekroz alanları boyanmadı. Sığırdan alınan II. ve III. olguda ise negatif sonuç alındı. Boyanma gözlenmedi.

Tartışma ve Sonuç

Tek ya da çift taraflı olduğu bildirilen (Wilcock, 1993) oküler yassı hücreli karsinoma bu çalışmada her 3 olgu da tek taraflı olarak rastlanmıştır. Oküler yassı hücreli karsinomların atlarda daha çok palpebra nictitans konjunktivasından (Gelatt, 1991; Wilcock, 1993), az olarak da göz kapağı, limbus, kornea, bulbar ve palpebral konjunktivadan köken aldığı, sığırlarda ise %90 oranında limbusta, %10 oranında korneada lokalize olduğu bildirilmiştir (Cordy, 1978; Gelatt, 1991; Özbilgin ve ark., 1991; Wilcock, 1993). Bu çalışmada ata ait materyal alt göz kapağından, sığır materyallerinin biri daha çok yerleşim gösteren korneadan, diğeri ise az yerleşim gösteren limbustan alınmıştır.

Kimi yazarlar oküler yassı hücreli karsinomlarda ırk ya da cins predileksiyonu olmadığını kaydederken (Cordy, 1978), kimileri (Gelatt ve ark., 1974; Gelatt, 1991) de atlarda göz kapağı karsinomlarının daha çok açık donlu atlarda ve özellikle de ağır yük taşımacılığında kullanılanlarda görüldüğünü, palpebra nictitansla yerleşen oküler yassı hücreli karsinom sık-

lığının göz kapağındaki pigment eksikliği ile orantılı olarak azaldığını bildirmişlerdir. Türkiye'de sadece bir olguda, Özbilgin ve ark. (1991 tarafından, Haflinger ırkı bir ata oküler yassı hücreli karsinom tespit edilmiştir. Bu çalışmada da Haflinger ırkı ata yassı hücreli karsinomun saptanmış olması dikkat çekici bulunmuş ve araştırmacıların bulgularıyla paralellik göstermiştir. Ancak olgu sayısının az oluşu bu durumun bir ırk predispozisyonu olarak değerlendirilmesi için yeterli değildir.

Oküler yassı hücreli karsinomların pretümöral displastik lezyonlardan (pretümöral dönem) geliştiği, daha sonra in situ karsinom ve en son olarak da invaziv karsinomların oluştuğu bildirilmiştir. Tüm evcil hayvan türlerinde pretümöral dönem görülmekte olup, bu dönem epidermal plak ya da papillom olarak da adlandırılmaktadır (Wilcock, 1993; Kubo ve ark., 1994; Jones ve ark., 1997). Bu çalışmada incelenen her üç olguda oküler yassı hücreli karsinomun son dönemi olan invaziv karsinom olarak değerlendirilmiştir.

İlk kez methylcolantrene ile oluşturulan fare sarkomlarında ortaya konulan p53 proteinini nüklear bir proteindir. Bu protein DNA'nın onarımına yönelik aktivitesini etkilemek suretiyle hücre siklusunda rol oynar. Hücre siklusunda oluşan değişiklik DNA onarımını bozarak

potansiyel mutasyonlara neden olur bu da kar-sinogenezise yol açar (Shen ve ark., 2002). p53 prote-ininin wild tipi'nin yokluğunda mutant p53 seviyesi artar. Moleküler genetik bulgulara göre çok sayıda hücrenel veya viral proteinlerin etkileşimi ile wild p53 fonksiyonu kaybolabilir ve kontrolsüz hücre üremesi şekillenir. p53 wild tipinin tüm normal hücrelerde eseri miktarda bulunduğu bildirilmektedir. Normal hü-crelerde bulunan wild tipin yarılanma ömrünün çok kısa olduğu (6-30dk), bu nedenle immunohistokimyasal yöntemlerle tespit edilecek düzeyde protein birikiminin olmadığı ifade edilmektedir (Taylor ve Cote, 1994). Mutant p53 proteinin ise yarılanma ömrü daha uzundur. Mutasyonların proteinin yarılanma ömrünü ve nükleer konsantrasyonunu artırarak, mutant p53 prote-inin immunohistokimyasal olarak saptanmasını sağ-ladığı bildirilmiştir (Field ve ark., 1991; Taylor ve Cote, 1994). Anormal mutant p53 birikimi evcil hayvanların oküler yassı hücreli karsinomlarında sıklıkla gö-rülmektedir. Bu durum, oküler yassı hücreli kar-sinomun karinogenezisinde, wild tip p53 proteininin görev yapamamasıyla açıklanmaktadır (Sironi ve ark., 1999). Karsinomlarda p53 proteininin aşırı üretilmesi, sadece malign tümörlerdeki genetik alterasyonların bir bulgusu olarak kabul edilmemektedir. Aynı zamanda hücrenel ya da viral onkoproteinlerin etkileşimi yoluyla proteinlerin stabilizasyonu veya wild tip p53'ün azalma mekanizmasındaki değişiklikler sonucunda p53 prote-inin aşırı üretilmesiyle şekillenebildiği be-lirtilmektedir (Teifke ve Lohr, 1996; Sironi ve ark., 1999). Neoplastik hastalıklarda p53'ün varlığını sap-tamaya yönelik yapılan bir çok çalışmada (Taubert ve ark., 1995; Sagartz ve ark., 1996; Sironi ve ark., 1999), pozitif hücrelerin %10'dan daha fazla veya %20 olması, mutasyonların göstergesi olarak kabul edilen p53 pozitifliğinin cut off (sınır değeri) olarak göz önünde bulundurulmaktadır. p53 geni tümör olu-şumunu baskılayan bir gen dir, immunohistokimyasal boyamada p53 proteininin görülmesi p53 genindeki mutasyonların bir göstergesidir. Sunulan çalışmada ata tümör hücrelerinde p53 proteininin difuz olarak bir-ikimini p53 genindeki mutasyonların ya da viral veya hücrenel onkoproteinlerin etkileşiminin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Literatürle uyumlu olarak ça-lışmada 1. olgudaki ata ait hücre çekirdekleri pozitif boyanmıştır. Ayrıca, p53 genindeki mutasyonlar (do-layısıyla mutant p53 protein miktarı) grade ve proliferasyon indeksi yüksek tümörler ile az di-ferensiye tümörlerde daha fazladır. Atta saptanan ol-guda da tümörün az diferensiye olmasının bir gös-tergesi olan tek hücre keratinizasyonunun bulunup-ğlobb komelerin olmaması tümörün az diferensiye ol-duğu ve dolayısıyla p53 genindeki ekspresyonun fazla olması nedeniyle pozitif boyandığı düşünülebilir. Ancak

Sironi ve ark.(1999)'nın yaptığı çalışmada sığıra ait 1 ol-guda pozitifliğe rastlanırken, bu çalışmada sığıra ait her iki olguda da p53 pozitiflik saptanamamıştır. Bo-yanmanın nedeni elde olmayan veya istenmeyen artefaktlar olabileceği gibi, p53'ün normal yıkılma ma yolunda şekillenen bir bozukluğa ya da hücrenel on-koprotein gibi başka bir proteinle bağlanarak inaktive olmasına da bağlı olabilir.

Ata ait bir ve sığıra ait iki olguda oküler yassı hü-c-reli karsinomlarında, p53 proteini varlığının im-munohistokimyasal olarak araştırıldığı bu çalışmada, yalnızca ata ait 1. olguda pozitif, sığıra ait iki olguda ne-gatif sonuç alınmıştır. Bu konuda daha çok sayıda ma-teryal ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu ka-rınisındayız.

Kaynaklar

- Brash, D.E, Rudolph, J.A., Simon, J.A. (1991). A role for sun-light in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 10124-10128.
- Campbell, C.A.G., Quinn, Y.S., Angus, R.B., Rees, J.L. (1993). P53 mutations are common and early events that precede tumor invasion in squamous cell neoplasia of the skin. *J. Invest.Dermatol.* 100, 746-748.
- Cordy, D.R. (1978). Tumours of the nervous system and eye. In "Tumours in Domestic Animals" Ed. J.E. Moulton, 3rd Ed.,443-453, University of California Press, Los An-geles.
- Çiftçi, M.K., Koç, Y., Kıran, M.M., Yener, Z. (1996). Ak-karaman ırkı iki koyunda oküler yassı hücreli kar-sinom. *Vet.Bil.Derg.* 12, 2, 143-146.
- Field, J.K., Spandidos, D.A., Malliri, A., Gosney, J.R., Yi-agnisis, M., Stell, P.M. (1991). Elevated p53 expression cor-relates with a history of heavy smoking in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br. J. Cancer.* 649, 573-577.
- Gelatt, K.N., Myers, V.S., Perman, V., Jessen, C. (1974). Conjunctival squamous cell carcinoma in the horse. *JAVMA*, 165, 7, 617-620.
- Gelatt, K.N. (1991). "Veterinary Ophtalmology", 4th ed., Lea&Febiger, USA.
- Jones, T.C., Jones, R.D., King, N.W. (1997). "Veterinary Pat-hology". 4th ed, 480-481. Williams&Wilkins, Inc., Baltimore, USA.
- Kanjila, S., Pierceall W.E., Cummings, K.K., Kripke, M.L., Ananthaswamy, H.N. (1993). High frequency of p53 mu-tations in ultraviolet radiation-induced murine skin tumors: evidence for strand bias and tumor heterogeneity. *Cancer Res.* 53, 2961-2964.
- Kubo, Y., Urano, Y., Yoshimoto, K. (1994). P53 gene mu-tations in human skin cancers and precancerous lesions: comparison with immunohistochemical analysis. *J. Invest. Dermatol.* 102, 440-444.
- Levine, A.J., Momand, J., Finlay, C.A. (1991). The p53 tu-

mour suppressor gene. Nature 351, 453-456.

Özbilgin, S., Kaya, M., Sönmez, G., Pekbilir, A. (1991). At'ta ocular Squamous Cell Carcinoma. U.Ü.Vet.Fak.Der. 1-3, 10, 53-60.

Pressnell, J.K., Schreibman, M.P. (1997). "Animal Tissue Techniques." 5th Ed., W.H. Freeman and Company, San Francisco, USA

Pierceall W.E., Mukhopadhyay, T., Goldberg, L.H., Anant-haswamy, H.N. (1991). Mutations in the p53 tumour suppressor gene in human cutaneous squamous cell carcinomas. Mol. Carcinogen 4, 445-449.

Ruggeri, B., Caamano, J., Goodrow, T. (1991). Alterations of the p53 tumor suppressor gene during mouse skin tumor progression. Cancer Res. 51, 6615-6621.

Sagartz, J.E., Bodley, W.L., Gamblin, R.M., Couto, C.G., Tierney, L.A., Capen, C.C. (1996). p53 tumor suppressor protein overexpression in osteogenic tumors of dogs. Vet. Pathol. 33, 213-221.

Shen, H., Zheng, Y., Sturgis, E.M., Spitz, M.R., Wei, Q. (2002). P53 codon 72 polymorphism and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study.

Cancer letters.

Sironi, G., Riccaboni, P., Mertel, L., Cammarata, G., Brooks, D.E. (1999). P53 protein expression in conjunktival squamous cell carcinomas of domestic animals. Veterinary Ophthalmology 2, 227-231.

Taylor, C.R., Cote, R.J. (1994). "Immunomicroscopy: A diagnostic tool for the surgical pathologist". 2nd Ed., Saunders Company, Philadelphia, USA.

Taubert, H., Würfl, P., Meye, A., Berger, D., Thamm, B., Neumann, K., Hinze, R., Schmidt, H., Rath, F.W. (1995). Molecular and immunohistochemical p53 status in liposarcoma and malignant fibrous histiocytoma. Identification of seven mutations for soft tissue sarcoma. Cancer 76, 1187-1196.

Teifke, J.P., Löhr, C.V. (1996). Immunohistochemical detection of p53 overexpression in paraffin wax-embedded squamous cell carcinomas of cattle, horses, cats, and dogs. J.Comp.Pathol. 114, 205-210.

Wilcock, B.P. (1993). The eye and ear. In "Pathology of Domestic Animals" Eds. K.V.F. Jubb, P.C. Wilcock, N. Palmer. 4th Ed., Vol. 1, 512-515. Academic Press Inc., San Diego, USA.