

SİGARA TİRYAKİLERİNİN NORMAL AĞIZ MUKOZALARINDA P53 PROTEİNİ

P53 OVEREXPRESSION IN NORMAL ORAL MUCOSA OF HEAVY SMOKERS

Dr. Nihat AYAN (*), Dr. İnci AYAN (), Dr. Canan ATATLI (***),
Dr. Semra D. GÜLER (****), Dr. Çağrı DALKILIÇ (*****),
Dr. Fikret ÇINAR (*****), Dr. Öner DOĞAN (*****)**

ÖZET: Baş - boyun kanserlerinin gelişmesinde sigara ve p53 tümör baskılayıcı gen değişikliklerinin erken dönemde rolleri olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir.

Bu çalışmada herhangi bir kanseröz veya prekanseröz lezyonu olmayan, beş yıldan daha uzun süre ve günde yirmiden fazla sigara içen 30 kişinin ağız mukoza biyopsi örneklerinde immunhistokimyasal yöntemle p53 proteini araştırılmıştır.

Histopatolojik incelemede 28 örnekte (%93) hiperplazi ve 9 örnekte (%30) displazi saptanmıştır. p53 D07 monoklonal antikor ile yapılan immunhistokimyasal incelemede sadece hiperplazi gösteren 20 örneğin 3'ünde ve displazi gösteren 9 örneğin 3'ünde olmak üzere toplam 6 (%20) örnekte pozitif reaksiyon görülmüştür. Sonuç olarak sigara tiryakilerinin ağız mukozalarında kanseröz veya prekanseröz lezyonlar olmadan önemli oranda hiperplazi, displazi ve p53 protein artışı oluşmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Sigara içimi, ağız mukozası, p53 geni

SUMMARY: The role of cigarette smoking and the p53 mutations in the early phase of carcinogenesis of head and neck cancer has been demonstrated in several studies.

In the present study, the frequency of p53 overexpression in the oral mucosa of 30 heavy smokers who have no overt precancerous or cancerous lesions is investigated. Histopathological evaluation revealed hyperplastic changes in 28 (93%) tissue samples and dysplastic changes in 9 (30%). Positive immunoreaction with the anti-p53 monoclonal antibody D07 was detected in 6 (20%) samples, 3 of which consisted of hyperplastic only epithelium (3/20) and the other 3 of dysplastic epithelium (3/9).

In conclusion, a significant percentage of hyperplasia, dysplasia and p53 overexpression occur in the oral mucosa of heavy smokers even in the absence of overt malignant or premalignant lesions.

Key Words: cigarette smoking, oral mucosa, p53

GİRİŞ

Birçok kanser tipinde p53 tümör baskılayıcı genin mutasyonları tanımlanmıştır (13,17). Baş ve boyun yassı hücreli kanserlerinin de %60-80'inde de p53 mutasyonlarının varlığı çeşitli moleküler ve immunhistokimyasal çalışmalar ile gösterilmiştir (10,19,20). Baş ve boyun prekanseröz lezyonlarında p53 mutasyonlarının saptanması ve bu mutasyonların

sıklığının displazi derecesi ile artış göstermesi, kolo-rektal kanser ve diğer epitelyal kanserlerde olduğu gibi baş boyun kanserlerinde de p53 değişikliklerinin erken dönemde oluştuğunu göstermektedir (22, 24, 27, 28).

Baş ve boyun kanserli hastaların ağız içlerinde tümörden uzak epitel bölgelerinde de farklı tipte p53 mutasyonları gösterilmiştir. Bu bulgu birden çok primer tümör gelişmesinde p53 mutasyonlarının rolü olduğu görüşünü desteklemektedir (18).

Günümüzde malign transformasyon yapısal ve çevresel risk faktörlerinin birlikte rol aldığı çok basamaklı bir süreç olarak kabul edilmektedir. Kanser gelişmesinde risk oluşturan önemli bir çevresel etmen sigara olup, akciğer, larenks, ağız boşluğu ve özofagus kanserlerinin gelişmesinden sorumlu tutulmaktadır. Ağız boşluğu kanserlerinin gelişme riskinin sigara

(*) Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Bakırköy, İSTANBUL

(**) İÜ. Onkoloji Enst. Ped. Onkoloji Bilim Dalı, İSTANBUL

(***) İÜ. Onkoloji Enst. Tümör Patolojisi, İSTANBUL

(****) SSK Hst. KBB Anabilim Dalı, K. MARAŞ

(*****) Karaelmas Üni. Tıp fak. KBB Bilim Dalı, ZONGULDAK

(*****) İ.Ü. Tıp Fak. Patoloji Bilim Dalı, İSTANBUL

ra dumanına maruz kalmakla arttığı ve günde yirmi den fazla sigara içen ağır tiryakilerde, (6). Öte yandan sigara ile ilişkisi olduğu bilinen yassı hücreli akciğer kanserlerinde p53 protein boyanmasında artış gösterilmiş ve böylece sigara ile p53 mutasyonları arasında ilişki olabileceği düşünülmüştür (15). Bu ilişki baş ve boyun yassı hücreli kanserlerinde ve prekanseröz lezyonlarında da tespit edilmiştir (4,12). Bu çalışmalara göre baş ve boyun yassı hücreli kanserlerinin oluşmasında p53 mutasyonları erken dönemde ortaya çıkmakta ve sigara p53 mutasyonlarına yol açmaktadır. Araştırmamızda; içen ancak kanser veya prekanseröz lezyonu olmayan kişilerde p53 mutasyonlarının oluşabileceği tezinden hareketle, yoğun sigara içen kişilerde immunhistokimyasal yöntemle p53 proteini araştırılmıştır.

YÖNTEM VE GEREÇLER

Bu araştırmanın materyalini beş yıldan daha uzun süre günde yirmiden fazla sigara içen ve ağız içinde herhangi bir lezyonu olmayan sağlıklı 30 gönüllü birey oluşturmuştur.

Deneklerin her birinden sigara tüketimi ile ilgili bilgiler alındıktan sonra dilaltı bölgesinden insizyonel biyopsiler yapıldı. Her bir biyopsi örneği %10 formalinde fikse edildikten sonra parafin blokları hazırlandı. Daha sonra seri halinde 5µm kalınlıkta kesilen doku blokları poly-1 lizin ile muamele edilip 55 C ısıda bir gece süresince kurutuldu. Kesitler deparafinize edildikten sonra distile su ile yıkandı. Doku örnekleri 75 ml sitrat buffer (1 litre distile suda 2.1 gr sitrik asit; 2M NaOH ile pH 6.0'ya ayarlandı) içine daldırılarak beşer dakika süre ile 2 kez 750 W'luk mikrodalga fırına yerleştirildi (1,26).

Mikrodalga işleminden sonra kesitler 20 dakika süre ile sıcak bufferde inhibe edildi ve daha sonra fosfat-buffer salin (PBS pH 7-6) içine yerleştirildi. İmmunhistokimyasal çalışmada anti p53 monoklonal antikor (p53 D07, Nova castra Laboratuvarları, 1:50 seyreltilmiş), biotin-HRP streptavidin amplifikasyon sistemi (KO 681 Dako, Denmark) ve AEC kromojen (KO696 Dako, Denmark) kullanıldı. Primer antikor oda ısısında 60 dakika süre ile uygulandı. Hücre çekirdekleri Mayer'in hematoksileni ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi. Pozitif kontrol olarak gen dizi analizi ile exon 7, kodon 248'de (C → T) mutasyonu saptanmış bir rabdomiyosarkom doku örneği (2), ayrıca p53 immunreaksiyonu pozitif olduğu bilinen bir nazofarenks karsinom doku örneği kullanıldı.

Negatif kontrol olarak aşılanmamış fare serumu kullanıldı. Her bir doku örneğinde p53 immunreaktivitesi en az 300 hücrede araştırıldı ve immunhistokimyasal boyanma gösteren çekirdek yüzdesine göre değerlendirme yapıldı. Hiç boyanma göstermeyen örnekler negatif, %1-33 boyanma gösteren örnekler zayıf pozitif, %34-66 boyanma gösteren örnekler orta derecede pozitif ve hücre çekirdeklerinin %67'si boyanan örnekler ise kuvvetli pozitif olarak kabul edildi (21).

Her bir doku örneği hemotoksilen eozinle boyanmış kesitlerde sigaraya bağlı değişiklikler yönünden de ayrıca incelendi. Histopatolojik olarak örtücü epitelde akantoz ve spinal hücre proliferasyonuna bağlı papillomatoz varlığı hiperplastik değişiklik olarak kabul edildi. Epithelyal hücrelerde düzensizlik, organizasyon bozukluğu ve atipi varlığında ise displazi düşünüldü. Bu bulgu özellikle bazal ve parabazal katlarda daha belirgin ise hafif, intermedier hücre katmanında da mevcutsa orta derecede displazi olarak kabul edildi.

SONUÇLAR

Doku örneklerinin alındığı 30 gönüllü bireyin 25'i erkek 5'i kadın olup yaş dağılımı 20-62 yaş (ortanca=39 yaş) arasında idi. Deneklerin 5-35 yıl (ortanca=14.5 yıl) arasında değişen sürelerde günde 20-40 (ortanca=25) sigara içtikleri öğrenildi (Tablo 1). Çalışmaya konu olan 30 kişinin fizik muayenelerinde ağız mukozalarında herhangi bir iyi huylu, prekanseröz veya kanseröz lezyon saptanmadı.

Değişken	Sayı	İmmunreaktivite	
		Pozitif	Negatif
Yaş (yıl)			
20-39	16	3	13
40	14	3	11
Sigara/gün			
20-29	20	3	17
30-40	10	3	7
Sigara içme (yıl)			
5-19	18	4	14
20	12	2	10

Tablo 1: Olgu özellikleri ve p53 protein immünreaktivitesi

Histopatolojik değerlendirmede 28 örnekte (%93) hiperplastik değişiklikler saptandı. Bu olguların sekizinde ek olarak displastik değişiklikler de görüldü. Bir olguda sadece displazi saptanırken, tek bir olguda epitel normal bulundu.

Dispfazi saptanan 9 olgunun (%30) sekizinde hafif derecede (fokal =4, diffuz =4) ve birinde ise orta derecede displazi görüldü.

Anti p53 antikoruna D07 ile pozitif immunreaksiyon 6 (%20) doku örneğinde saptandı. Çekirdek boyanması iki olguda hücrelerin %18'inde, iki olguda %12'sinde, bir olguda %9'unda ve bir olguda %8'inde görüldü. Sadece bir olguda (%9 boyanma gösteren olgu) çekirdek boyanmasının yanısıra sitoplazmada da hafif boyanma gözlemlendi. Pozitif immun reaksiyon, displazik değişiklik gösteren 9 doku örneğinin üçünde (%15) ve sadece hiperplazi gösteren 20 örneğin (%33) bazal ve parabazal hücrelerde saptandı (Tablo 2).

p53	EPİTEL			Toplam
	Reaktivitesi	Normal	Hiperplazi	
Pozitif	0	3 (%15)	3 (%33)	6 (%20)
Negatif	1	17 (%85)	6 (%66)	24 (%80)
Toplam	1	20	9	30

* Dokuz displastik örneğin 8'i displaziye ek olarak hiperplazi de göstermekte idi.

Tablo 2: p53 pozitif ve negatif örneklerde epitel özellikler

TARTIŞMA:

Baş ve boyun yassı hücreli kanser olgularında p53 mutasyonlarını araştırmaya yönelik çalışmalar, bu hastaların hiperplastik ve displastik lezyonlarında %15-70 oranında, normal mukozalarında ise daha düşük oranlarda p53 mutasyonları olduğunu göstermiştir (3,14,18,22,24). Yine bu çalışmalarda p53 mutasyon sıklığının hiperplazidan displaziye ve displaziden karsinoma geçişte göreceli olarak arttığı belirtilmekte ve p53'ün baş ve boyun karsinogenezinin erken dönemlerinde rol oynadığı sonucunda birleştirilmektedir (3,14,18).

Birçok moleküler ve immunhistokimyasal çalışmada sigara içenlerde p53 mutasyonlarının büyük bir bölümünün 220, 245-248 ve 278-281 kodonlarında G → A, G → T veya G → C transversiyonları veya delesyonlar şeklinde geliştiği bildirilmektedir (3,4,7,10,11,12,16,25). Sigara içenlerde baş ve boyun kanserlerinin gelişmesi sırasında oluşan erken lezyonlarda belirli p53 mutasyon modellerinin görülmesi, aktive olmuş tütün karsinogenleri tarafından oluşturulan DNA hasarının selektif olarak p53'ü inaktive ettiği ve bunun sonucunda klonal büyüme ve progresyon olduğu varsayımını kuvvetlendirmektedir (3,7). Öte yandan human papilloma virüs (HPV) ile enfekte kişilerde sigara ile ilgili kanserlere yatkınlığın artmış olması, p53 inaktivasyonunda HPV'nin de rolü olabileceğini düşündürmektedir (7).

Bu çalışmada herhangi bir görülebilir oral lezyonu olmayan sigara tiryakilerinde %20 oranında p53 protein artışı gösterilmiştir. Morfolojik incelemede ise %93 oranında hiperplastik ve %30 oranında displastik değişikliklerin olduğu belirlenmiştir. p53 pozitifliği sadece hiperplazi gösteren örneklerin %15'inde, displazi gösterenlerin ise %33'ünde saptanmıştır. Bu oranlar baş ve boyun kanserli hastaların hiperplastik ve displastik lezyonlarında saptanan p53 pozitiflik oranları kadar yüksektir.

Her ne kadar çalışmamızda premalign ve malign lezyon olmadığı halde yüksek oranda p53 mutasyonlarının varlığı gösterilmişse de p53 mutasyonlarının hiperplazi ya da displazi gibi değişikliklerden önce mi, sonra mı geliştiği konusuna açıklık getirilmemiştir. p53 mutasyonlarının gelişme zamanının belirlenebilmesi için daha fazla sayıda normal epitele sahip örnekler gereksinim vardır. Bizim çalışmamızda sadece bir tek örnekte epitel normal raporlanmış ve bu olguda p53 immunreaktivitesi negatif bulunmuştur. Daha kısa süre ve /veya daha az sigara tüketen büyük gruplarda daha fazla olguda normal epitel saptanabilir ve bu olguda p53 protein artışı araştırılabilir. Çalışmamızda p53 inaktivasyonu mekaiizması açıklamak için moleküler yöntemlerle p53 mutasyon modelinin belirlenmesine gereksinim vardır. Ancak bu şekilde tütün karsinogenleri ve/veya HPV p53 inaktivasyonundan sorumlu tutulabilir. Bir ön çalışma niteliği taşıyan çalışmamız, klinik olarak normal ağız mukozalarına sahip sigara tiryakilerinde önemli ölçüde hiperplazi, displazi ve p53 mutasyonlarının varlığını ortaya çıkarmıştır. Sonuçlarımız p53 değişikliklerinin transformasyonun erken döneminde orta-

ya çıktığını gösteren çalışmalara uygunluk göstermektedir. Ayrıca çalışmamızda transformasyonun başladığı ancak henüz karsinomun gelişmediği bir risk grubu belirlenmiş olup bu olgular "chemoprevention" için uygun adaylar olabilir. İzleyen çalışmalarda uygulanacak moleküler analizler ile sigara ve p53 mutasyonları arasındaki ilişki daha iyi belirlenebilir. Ayrıca tükürkte yapılacak moleküler tarama çalışmaları ile (23) sigara içenlerde p53 mutasyonları daha kolay belirlenebilir ve bu kişiler kanser önleyici tedavi programlarına alınabilir.

Yazışma Adresi: Dr. Nihat AYAN
Bakırköy Dr. Sadi Konuk
Eğitim ve Araştırma
Hastanesi İSTANBUL

KAYNAKLAR

1. AYAN I, DOĞAN Ö, KEBUDI R, ET AL: Immunohistochemical detection of p53 protein in rhabdomyosarcoma. Association with clinicopathological features and outcome. J Pediatr Hematol Oncol. 19: 48-53, 1997.
2. AYAN I, LUCA JW, JAFFE N, STRONG LC, HANSEN MF: Denovo germline mutations of the p53 gene in young children with sarcomas. Oncology Reports. 4: 679-683,1997.
3. BOYLE JO, HAKIM J, KOCH W, ET AL: The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. Cancer Res. 53: 4477,4480, 1993.
4. BRENNAN JA, BOYLE JO, KOCH WM, ET AL: Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous celi carcinoma of the head and neck. N Eng J Med. 332: 712-717, 1995.
5. CHIBA I, TAKAHASHI T, NAU M, ET AL: Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer, Oncogene. 5: 1603-1610, 1990.
6. CULLEN JW: Principles of cancer prevention: Tobacco in Devita VT, Hellmans, Rosenberg SA (eds): Cancer: Principles and Practice of Oncology. 3rd edit. JB Lippincott Company, Philadelphia , pp 181-195,1989.
7. DAVIDSON BJ, HSU TC, STIMSON P, SCHANTZ MD: The genetics of tobacco induced malignancy. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 119: 1198-1205,1993.
8. DURSUN G, ET AL: Overexpression of p53 in laryngeal carcinoma: clinicopathological implications. Ear Nose Throat J. 1995; 74: 645-648. PMID: 8565866 UI: 96094069.
9. EL NAGGAR AK, LAI S, LUMA M , ET AL: Sequential p53 mutation analysis of pre-invasive and invasive head and neck squamous celi carcinoma. Int J Cancer. 64: 196-20, 1995.
10. FIELD JK: The role of oncogenes and tumor suppresser genes in the aetiology of oral head and neck squamous cell carcinoma J Royal Soc Med. 88:35-38, 1995.
11. FIELD JK, PAVELIC ZP, SPANDIDOS DA, STAMBROOK PJ, JONES AS, GLUCKMAN JL: The role of p53 tumor suppressor gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 119: 1118-1122, 1993.
12. FIELD JK, SPANDIDOS DA, MALLIRI A, GOSNEY JR, YIAGNISIS M, STELL PM: Elevated p53 expression correlates with a history of heavy smoking in squamous celi carcinoma of the head and neck. Br. J Cancer 64: 573-577,1991.
13. HOLLSTEIN M, SHOMER B, GREENBLATT M, ET AL: Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. Nucleic Acids Res. 24:141-146,1996
14. ICHILKAWA M, ISHII K, NAKAJIMA T, MOGI K: The overexpression of p53 and proliferative activity in precancerous and cancerous lesions of oral squamous epithelium. J Exp Clin Cancer Res 16: 141-146,1997.
15. IGGO R, GATTER K, BARTEK J, LANE D, HARRIS AL: Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. Lancet, 675,1990.

16. LAZARUS P, STERN J, ZWIEBEL N, FAIR A, RICHIE JP JR, SCHANTZ S: Relationship between p53 mutation incidence in oral cavity squamous cell carcinoma and patient tobacco use. *Carcinogenesis*. 17:733-739,1996.
17. LEVINE AJ, MOMAND J AND FINLAY CA: The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, 351: 453-456, 1991.
18. NESS M, HOMANN N, DISCHER H, ET AL: Expression of mutated p53 occurs in tumor -distant epithelia of head and neck cancer patients: A possible molecular basis for the development of multiple tumors. *Cancer Res*. 53: 4189-4196,1993.
19. NYLANDER K, NILSSON P MEHLE C, ROOS G: p53 mutations, protein expression and cell proliferation in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* 71: 826-830, 1995.
20. NYLANDER K, STENLING R, GUSTAFSSON H, ZACKRISSON B, ROSS G: P53 expression and cell proliferation in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 75: 87-93, 1995.
21. PAVELIC ZP, PORTUGAL LG, GOOTEE MJ ETAL: Retrieval of p53 protein in paraffin-embedded head and neck tumor tissues. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 119: 1206-1209, 1993.
22. REGEZI JA, ZARBO RJ, REGEV E, PISANT S, SILVERMAN S, GAZIT D: p53 protein expression in sequential biopsies of oral dysplasia and insitu carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 24:18-22, 1995.
23. SIDRANSKY D, BOYLE J, KOCH W: Molecular screening. Prospects for a new approach. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 119: 1187-1190,1993.
24. SHIN DM, KIM J, RO JY, ET AL; Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res*. 54: 321-326,1994.
25. SOMERS KD, MERRICK MA, LOOEZ ME, INCOGNITO LS, SCHECHTER GL, CASEY G: Frequent p53 mutations in head and neck cancer. *Cancer Res*. 52: 5997-6000,1992.
26. VAN DER BERG FM, BAAS IO, POLAK MM, OFFERHAUS GJA: Detection of p53 overexpression in routinely paraffin embedded tissue of human carcinomas using a novel target unmasking fluid (TUF). *Am J Pathol*. 142:381-385,1993.
27. WARNAKULASURIYA KA, JOHNSON NW: Expression of p53 mutant nuclear phosphoprotein in oral carcinoma and potentially malignant oral lesions. *J Oral Pathol Med*. 21: 404-408, 1992.
28. WOOD MW, MEDINA JE, THOMPSON GC, HOUCK JR, MIN KW: Accumulation of the p53 tumor suppressor gene product in oral leukoplakia. *Otolaryngol, Head Neck Surg*, 111: 758-763, 1994.

