

Hodgkin Hastalığında P53 Ve Bcl-2 Proteini Sıklığı Ve Klinik Verilerle İlişkisi: İmmunohistokimyasal Çalışma

Selçuk BİLGİ¹, Muzaffer DEMİR², Latife CANDAN¹, Özden VURAL³

ÖZET

Amaç: Normal hücre siklusunda tümör süpresör gen olarak rol alan p53 proteini ile apoptosisi inhibe eden bcl-2 proteinin Hodgkin Hastalığındaki (HH) sıklığı, histolojik suptip, klinik evreleme, B semptomları ve bu iki proteinin birlikte pozitifliği ile ilişkisi araştırılmıştır.

Materyal ve metod: 36 olgu morfolojik ve immunohistokimyasal yöntemle CD15 ve CD30 antikoları kullanılarak tekrar değerlendirildi. Tüm olgular immunohistokimyasal olarak anti-p53 ve anti-bcl-2 monoklonal antikolarla (DAKO A/S Denmark) boyandı.

Bulgular: Tüm olguların %27.7'sinde (10/36) p53, %25.0'inde (9/36) bcl-2 ve %11.1'inde (4/36) hem p53 hemde bcl-2 pozitifliği saptandı.

Sonuç: Sonuç olarak p53, bcl-2 ve birlikte pozitifliğinin histolojik suptip, klinik evreleme, B semptomları ile istatistiksel bir ilişki saptanmadı.

Anahtar Sözcükler: Hodgkin, p53, bcl-2, klinik veriler, immunohistokimya

SUMMARY

THE FREQUENCY OF p53 and bcl-2 PROTEIN and THEIR RELATIONSHIP WITH CLINICAL FINDINGS IN HODGKIN'S DISEASE

Purpose: In this study, we investigated the frequency of p53 protein which plays an important role as a tumor suppressor gene in normal cell cycle and apoptosis inhibating bcl-2 protein in Hodgkin's disease. In addition, the relationship among the frequency of p53 and bcl-2 protein expression and histologic subtypes, clinical staging and B symptoms were analyzed.

Method: Thirty-six cases were reevaluated morphologically and immunohistochemically by using monoclonal antibodies of CD15 and CD30. Each case was stained by monoclonal anti-p53 and anti-bcl-2 protein (DAKO A/S Denmark).

Results: p53 was found to be positive in 27.7 % (10/36) of the cases, bcl-2 was positive in 25.0 % (9/36) of the cases and in 11.1 % (4/36) of the cases p53 and bcl-2 concurrent expression was determined.

Conclusion: In conclusion, no statistically significant relation among p53, bcl-2 and concurrent expression of these two proteins and histological subtype, clinical staging and B symptoms could be found.

Key words: Hodgkin, p53, bcl-2, clinical data, immunohistochemistry

GİRİŞ

Hodgkin hastalığında (HH) neoplastik hücrelerin orijini ve neoplastik gelişimin aşamaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Patogeneizde tümör süpresör genin, apoptosisi inhibe eden genlerin ve bazı viral proteinlerin rolü olduğu ileri sürülmüştür (1-4).

P53, apoptosisin kontrolünde ve normal hücre siklusunda, G₁ fazından S fazına geçişi kolaylaştıran bir tümör süpresör gendir (2,3).

Tümör hücresinde p53 genindeki değişimler ve p53 proteininin inaktivasyonu, apoptosisi inhibisyonuna ve hücre çoğalmasına yol açar. Genetik değişimlerin sıklığı solid tümörlere nazaran, hematolojik malignansilerde daha az oranda saptanmıştır (1). P53 proteinin inaktivasyonu veya genetik bozukluğu, klinik olarak tümör yükünün fazlalığı, agresivite,

¹ Yrd.Doç.Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji A.D.

² Yrd.Doç.Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji B.D.

³ Prof.Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji B.D.

kötü prognoz, tedaviye direnç ve nüks ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (3,4).

Mitokondrial bir proteini kodlayan bcl-2 protoonkogeni, esas olarak programlı hücre ölümünde rol oynar. Değişik uyaranları takiben apoptosisi bloke etme yeteneğinde olup, t(14;18) kromozomal translokasyon ile ilişkili olabildiği bildirilmiştir. Ancak bcl-2 proteininin ekspresyonu için (14;18) kromozomal translokasyonu olması şart değildir (5). Neoplastik hücreler yanında, normal hücrelerde de bcl-2 ekspresyonu görülür (6). Bcl-2 proteini apoptosisi inhibe veya bloke ederek immatür öncü hücre popülasyonunun artmasına yol açar (6,7).

Son yıllarda yapılan çalışmalar p53 ve bcl-2 proteinlerinin lenfoid hücrelerin neoplastik transformasyonunda ilgili mekanizmalarda rol aldıkları ve her iki proteinin ekspresyonunun hematolojik neoplazm progresyonunda önemli basamakları oluşturdukları düşünülmektedir (1-4,7).

Bu çalışmada p53 ve bcl-2 proteinlerinin HH'da görülme sıklıkları, klinik evre, histolojik tip, B semptomları ile ilişkileri çalışılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Trakya Üniv. Tıp Fakültesi Patoloji ABD'da, 1988-1997 yılları arasında Hodgkin Hastalığı tanısı almış 36 adet olgu çalışma kapsamına alınmıştır. Tüm olgular parafine gömülü materyaller olup, olguların tümü morfolojik ve immunohistokimyasal (İHK) yöntemle (parafin bloklar CD 15 ve 30 monoklonal antikorlarla boyanmıştır) ve Rye sınıflaması kullanılarak tekrar tanıları doğrulanmıştır.

Seçilen parafin bloklardan her olguya anti-p53 (monoklonal, Clone:DO-7, DAKO A/S, Denmark) ve anti-bcl-2 (monoklonal, Clone:İL 4, DAKO A/S, Denmark) antikorları İHK yöntemle uygulandı. Anti-p53 monoklonal antikor hem "wild", hem de "mutant" tip intrasellüler p53 proteini ile reaksiyona girmektedir. İHK boyanma streptavidin-biotin ile işaretli kitlerle alkalın fosfataz-peroksidaz yöntemle uygulanmıştır. Boyanma işleminde mikrowave fırın inkübasyonu kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak hazır slide'lar, pozitif kontrol olarak ise daha önce pozitifliği bilinen meme kanseri olgusu kullanılmıştır.

Tablo 1: Olguların Özellikleri

	n	Ya° (Dağ.Gen)	Noduler Skleroz	Mikst Tip	Lenfositten Zengin Tip	Lenfositten Fakir Tip
Erkek	23	39.52±19.78 (4-80)	8	9	5	1
Kadın	13	28.31±14.86 (7-60)	10	1	-	2

Toplam 36(%100) 18(%50) 10(%28) 5(%13.6) 3(%8.3)

BULGULAR

Olguların 23'ü erkek (%63.88; ortalama yaş 39.52±19.78 yıl; dağılım genişliği 4-80), 13 kadındır (%36.11; ortalama yaş 28.31±14.86 yıl; dağılım genişliği 7-60). Olgular histolojik subtip olarak değerlendirildiğinde; 18 adet (%50) noduler skleroz (NS), 10 adet (%28) mikst

sellüler (MS), 5 adet (%13.6) lenfositten zengin (LZ) ve 3 adet (%8.3) lenfositten fakir (LF) tip saptandı (Tablo 1). LZ tipte 3 olgu nodüler, 2 olgu diffuz pattern göstermektedir. Klinik verileri elde edilebilen 20/36 olgunun 4'ü Evre I, 7'si Evre II, 3'ü Evre III, 6'sı Evre IV'de idi ve 12/20'sinde B semptomları vardı (Tablo II).

Tablo 2: Klinik Bulgular ile p53 ve bcl-2 Pozitif Boyanma Sonuçları

Histo. Tip	Klinik Evre				B semp.	P53 +	bcl-2 +	p53+bcl-2(+)
	1	2	3	4				
NS	2	5	-	-	3/12	5/18	6/18	3/18
MT	2	2	1	3	6/12	4/10	3/10	1/10
LZ	-	-	1	2	2/12	1/5	0/5	0/5
LF	-	-	1	1	1/12	0/3	0/3	0/3
n=	4	7	3	6	12/12	10/36	9/36	4/36

p53 pozitifliği: p53 pozitifliği değişik şiddetlerde olmak üzere toplam 36 olgunun 10 tanesinde saptandı (%27.7). Boyanma RS/H ve varyantları ile sınırlı idi. Pozitiflik oranını sıralarsak mikst sellüler tip 4/10 (%40), nodüler sklerozan tip 5/18 (%27.7) ve lenfositten zengin tip (1/5;%20) olarak bulundu. Lenfositten fakir tipinde ise pozitiflik saptanamadı (0/3) (Tablo II). P53 pozitifliği mikst tipte oran olarak fazla olmasına rağmen, subtipler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir dağılım göstermedi ($\chi^2=2.049$, $p=0.562$).

bcl-2 pozitifliği: Bcl-2 pozitifitesi, 36 olgunun 9'unda (%25) izlendi. Bu boyanma zayıf olarak değerlendirilerek, çevre dokulardaki lenfositlerin % 83.3'ünde (30 olgu) stoplazmik boyanma saptandı. Bcl-2 pozitifitesi nodüler sklerozan (6/18;%33.3) ve mikst sellüler tipte (3/10;%33.3) eşit olarak gözlenmesine rağmen, lenfositten zengin ve fakir tipinde hiç pozitiflik saptanamadı (Tablo II). Bcl-2 pozitifitesi histolojik subtiplerde istatistiksel olarak anlamlı bir dağılım göstermedi ($\chi^2=3.467$, $p=0.325$).

p53+bcl-2 pozitifliği: p53 ve bcl-2'nin beraber pozitifliği sadece 4 olguda saptandı (4/36;%11.1). Bu 4 olgunun 3'ü nodüler skleroz, 1'i ise mikst sellüler tipti (Tablo II). Bu iki proteinin birlikte pozitifliğinin histolojik subtiplere göre dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir dağılım saptanamadı ($\chi^2=1.575$, $p=0.665$). B semptomları ile p53 ve bcl-2 proteinin birlikte pozitifliği arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamadı ($\chi^2= 6.222$, $p=0.105$). Hastalığın klinik evresi ile p53 ve bcl-2 proteininin pozitifliği arasında olgu sayısının azlığı nedeniyle, istatistiksel bir değerlendirme yapılamamıştır.

TARTIŞMA

Yapılan çalışmalarda Hodgkin hastalığında p53 pozitifitesi %20-74 arasında bildirilmiştir (8-15). Biz çalışmamızda %28.4

oranında p53 pozitifitesi saptadık. Bu farklılığın nedeni, çalışmalarda kullanılan farklı antikor paneli ve/veya kullanılan farklı fiksatif materyalinin olması, ve/veya taze dokunun kullanılması diye düşünülmektedir. İHK yöntemle p53 pozitif olarak saptanan olguların tümünde genetik değişim; genetik değişim olan olguların tümünde ise İHK yöntemle p53 gösterilememiştir (15-16). Çalışmamızda p53 pozitifitesi nukleusta ve genellikle R-S/H hücreleri ve varyantları ile sınırlı idi. Küçük lenfositlerde boyanma saptanamadı. Bu bulgu daha önceki çalışmalarda da saptanmış olup, çevredeki lenfositlerin malign klonla ait olmadıklarını; HH'da neoplastik komponentin R-S hücreleri olduğunu göstermektedir (10,14,15).

Çalışmamızda bcl-2 pozitifitesi R-S/H hücrelerinde %25 oranında saptandı. Boyanma şekli genellikle zayıf ve sitoplazmik idi. 36 olgumuzun 32'sinde çevredeki lenfositlerde bcl-2 pozitifitesi değişik şiddetlerde saptandı. Bcl-2 pozitifliğinin normal ve lenfoid dokularda izlenebilmekte ve bcl-2'yi normal lenfositler eksprese etmektedirler. Fakat bu pozitifliğin (14/18) translokasyonu için spesifik olmadığı gösterilmiştir (7). Bu farklılık translasyonel veya post-translasyonel uyarılarla ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Dolayısıyla yapılan bir çok çalışmada HH'nın neoplastik popülasyonunu oluşturan R-S/H'de bcl-2 pozitifliği yüksek oranlarda değildir. HH'da bcl-2 pozitifliği çok değişik oranlarda bildirilmiştir. Çalışmamızdaki bcl-2 boyanma paterni nonspesifik olarak değerlendirildi. Bazı olgularımız kuvvetli pozitif olarak boyanırken,

bazıları zayıf boyanma gösterdi. Bu boyanma özellikleri histolojik subtiplerle ilişkili değildi. Halbuki Lones ve ark.'larının (17) yaptığı çalışmada mikst sellüler tipine (%24) göre, noduler sklerozda (%59) daha fazla pozitivite saptanmıştır. Bu karışık boyanma paterni bcl-2 proteininin ekspresyonunun değişik varyasyonlu olduğu düşüncesini desteklemektedir.

Bu iki proteinin apoptosiste rol aldıkları düşünülerek, HH'nda sinerjistik veya resiprokal bir etki açısından bakıldığında, çalışmamızda p53 ve bcl-2 proteinlerinin beraberce aynı olguda görülme sıklıkları %11.1 (4/36) saptanmıştır.

Xerri ve arkadaşları (13) p53 pozitivitesini klinik evre, B semptomları, nüks

olasılığı ve hastaliksız yaşam süresi ile bir ilişki bulamamışlardır. Bizim çalışmamızda da elde edilen veriler aynı yöndeydi (histolojik tip ve B semptomları).

Sonuç olarak immunohistokimyasal yöntemle p53 ve bcl-2 proteinlerini subtiplerden bağımsız olarak tetkik edilmekte, ancak aldıkları rolün önemi halen aşikar olarak gösterilememektedir. P53 pozitifliği R-S/H ile sınırlı olması, neoplazi oluşumundaki bir komponent olarak rolünü göstermekle beraber, tümör progresyonunda p53 ve bcl-2 pozitifliğinin birlikteliği bir anlam göstermemiştir. Bu bulgular ışığında her iki proteinin neoplastik gelişimdeki rolleri tam aydınlatılamamıştır.

KAYNAKLAR

1. Preudhomme C and Fenaux P: The Clinical Significance of Mutations of the p53 Tumour Suppressor Gene in Haematological Malignancies. *Br J Haematol* 1997, 98, 502-511.
2. Carson DA, Lois A: Cancer Progression and p53. *Lancet* 1995, 346: 1009-1011.
3. Prokocimer M and Rotter V: Structure and Function of p53 in Normal Cells and Their Aberrations in Cancer Cells: Projection on the Hematologic Cell Lineages. *Blood* 1994, 84;8, 2391-2411.
4. Imamura J, Miyoshi I, Koeffler HP: p53 in Hematologic Malignancies. *Blood* 1994, 84;8, 2412-2421.
5. Pezella F, Tse AGD, Cordell JL et al: Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am J Pathol* 1990; 137:225-232.
6. Limpens J, de Jong, van Krieken JHJM et al: bcl-2/JH rearrangements in benign Lymphoid Tissues with Follicular Hyperplasia. *Oncogen* 1991; 6:2271-2276.
7. Inghirami G and Frizzera: Role of the Bcl-2 Oncogen in Hodgkin's Disease. *Am J Clin Pathol* 1994, 101:681-683
1. Dousis IA, Pezzella F, Lane DP, Gatter KC, Phil D and Mason DY. An Immunocytochemical Study of p53 and bcl-2 Protein Expression in Hodgkin's Disease. *Am J Clin Pathol* 1993, 99:663-667.
9. Pasman PC, Tiebosch A, Erdkamp FL, Vrints LW, Breed WP, Schouten HC: P53 as a marker of the malignant cell in Hodgkin's Disease. *Ann Oncol* 1994 5 Sup, 1: 89-91
10. Dousis-Anagnostopoulou IA, Remadi S, Kaklamanis L, Pezzella F, Gatter KC: Detection of p53 in Hodgkin's Disease Using the Monoclonal Antibody Pab248. *J Pathol* 1996;178:170-172
12. Gupta RK, Norton AJ, Thompson IW, Lister TA, Bodmer JG: p53 Expression in Reed-Stenberg Cells of Hodgkin's Disease. *Br J Cancer* 1992; 66: 649-652
13. Doglioni C, Pelosio P, Mombello A, Scerpa A, Chilosi M: Immunohistochemical evidence of abnormal expression of the antioncogen-encoded p53 phosphoprotein in Hodgkin's Disease and CD30+anaplastic lymphomas. *Haematol Pathol* 1991;5:67-73.
14. Xerri L, Bouabdallah R, Camerlo J and Hassoun J: Expression of the p53 Gene in Hodgkin's Disease: Dissociation Between Immunohistochemistry and Clinicopathological Data. *Hum Pathol* 1994, 25:449-454
15. Martinez Martinez-Delgado B, Robledo M, Arranz E, Infantes F, Echezarreta G, Marcos B, Sanz C, Rivas C, Benitez J: Correlation Between Mutations in p53 Gene and Protein Expression in Human Lymphomas. *Am J Hematol*, 1997; 55:1-8
16. Brousset P, Benharroch D, Krajewski S, Laurent G, Meggetto F, Rigal-Huguet F, Gopas J, Prinsloo I, Pris J, Delsol G, Reed JC, Schlaifer D: Frequent Expression of the Cell Death-Inducing Gene Bax in Rec-

HODGKIN HASTALIĞINDA P53 VE BCL-2 PROTEİNİ SIKLIĞI VE---

Steinberg Cells of Hodgkin's Disease.
Blood 1996;87:6,2470-2475

1. Battifora H: p53 Immunohistochemistry: A Word of Caution. Hum Pathol 25;5:435-437
18. Lones MA, Geraldine SP, Shintaku IP, Said JW: bcl-2 Oncogen Protein is Preferentially

Expressed in Reed-Stenberg Cells in Hodgkin's Disease of the Nodular Sclerosis Subtype. Am J Clin Pathol 1994; 102:464-467.