

Normal ve neoplastik tiroid dokusunda p53 ve Ki67 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi

The evaluation of p53 and ki67 immune reactivity in normal and neoplastic thyroid tissues

Banu YILMAZ ÖZGÜVEN, Yeşim ERDEM, Fevziye KABUKÇUOĞLU
Tuğba TAŞKIN, Nedim POLAT

Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarı

ÖZET

Giriş: p53 hücre siklus düzenleme mekanizmalarının merkezinde bulunan önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Ki67'nin dokuda gösterilmesi ise proliferasyon aktivitesinin ölçümünü sağlar. Bu çalışmada, normal tiroid, fetal tiroid, hiperplastik nodül, folliküler adenom ve papiller karsinomda p53 ve Ki67'nin immünohistokimyasal boyanma profilleri araştırılmıştır.

Gereç ve yöntem: Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarında hiperplastik nodül, folliküler adenom ve papiller karsinom tanısı verilen 53 tiroid operasyon materyali yanısıra, 5 fetal tiroid ve 5 normal tiroid dokusu çalışma kapsamına alındı. Bu vakalara Ki67 ve p53 immünohistokimyasal boya çalışmaları uygulandı. Her iki immün belirteç için nükleer boyanma değerlendirmeye alınarak sayım işlemi yapıldı.

Bulgular: Fetal tiroid, normal tiroid, hiperplastik nodül olgularında Ki67 ve p53 için boyanma saptanmadı. Yirmi folliküler adenom olgusunun 3'ünde Ki67 için olumlu boyanma elde edilirken, p53 için boyanma saptanmadı. Yirmi üç papiller karsinom olgusunun ise 19'unda Ki67 ile, 6'sında da p53 ile olumlu boyanma saptandı. Bu bulgulara göre, papiller karsinomda p53 ve Ki67 boyanma oranları, folliküler adenom, hiperplastik nodül, fetal tiroid dokusu ve normal tiroid dokusuna göre anlamlı ölçüde yüksek bulundu (Ki67 için $p < 0,0001$ ve p53 için $p < 0,05$).

Sonuç: Papiller karsinomların, genel olarak düşük proliferasyona sahip tümörler olmakla birlikte, benign tiroid tümörleri ve normal tiroid dokusuna göre daha proliferatif olduğu ve p53 gen ekspresyonunun varlığı gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Tiroid, papiller karsinom, p53, Ki67

SUMMARY

Objective: p53 is an important transcription factor in the centre of cell cyclus coordination mechanisms. The staining of Ki67 in the tissue helps to evaluate the proliferation activity. The immunohistochemistry staining profiles in normal thyroid, fetal thyroid, hyperplastic nodule, follicular adenoma and papillary carcinoma have been investigated using p53 and Ki67 in this study.

Study design: Fifty three thyroid operation materials diagnosed in the Pathology Laboratory of Şişli Etfal Training and Research Hospital, as hyperplastic nodule, follicular adenoma and papillary carcinoma were studied. Five fetal thyroid and 5 normal thyroid tissues were also included in the study. Ki67 and p53 immunohistochemistry stains were applied. Nuclear staining was evaluated for both of the immune indicators and the number of stained cells were calculated.

Results: Immunostaining was not observed for Ki67 or p53 stains in fetal thyroid, normal thyroid and hyperplastic nodules. Positive staining was established for Ki67 in 3 of 20 follicular adenomas, but staining was not observed for p53. In 19 of 23 papillary carcinomas, there was staining for Ki67. In 6 of 23 papillary carcinomas, there was staining for p53. The staining rates of p53 and Ki67 staining for the papillary carcinoma were significantly high, when compared with follicular adenoma, hyperplastic nodule, fetal thyroid and normal thyroid tissues. ($p < 0,0001$ for Ki67 and $p < 0,05$ for p53).

Conclusions: Although papillary carcinoma are tumors with low proliferation activity, they were found to be more proliferative and have p53 gene expression when compared with benign thyroid tumors and normal thyroid tissue.

Key words: Thyroid, papillary carcinoma, p53, Ki67

Yazışma Adresi:

Uzm. Dr. Banu Yılmaz ÖZGÜVEN
Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Patoloji Laboratuvarı
Tel: (0212) 231 22 09/ 1340-1348
Fax: (0212) 231 66 71
e-mail: banuyilmaz@yahoo.com

GİRİŞ

p53 proteini, 17. kromozomun kısa koluna lokalize bir fosfoproteindir. Doğal ve mutant olmak üzere 2 tiptir (1). DNA sentezinde, tamirinde ve programlanmış hücre ölümünde düzenleyici role sahiptir. p53 insan kanserlerinde en sık değişikliğe uğrayan gen ve inaktivasyonu insan karsinogenezisinde anahtar olay olarak kabul edilmektedir. İnsan tümörlerinin

yarısından fazlasında p53 mutasyonları saptanmıştır.

Doğal tip p53 protein, genellikle immunohistokimyasal olarak gösterilemezken; buna zıt olarak ortaya çıkan mutant tip p53 protein, uzun yarı ömrü nedeniyle nükleusta birikir ve monoklonal antikolar ile immunohistokimyasal olarak gösterilebilirler (2, 3, 4).

p53'ün eskiden onkogen olduğuna inanılırdı. Günümüzde hem onkogen hem de antionkogen olarak davranabileceği anlaşılmıştır, çünkü mutant formları birçok onkogen gibi transkripsiyonu aktive edebilir ve hücreleri transforme edebilir.

Birçok değişik insan tümöründe p53 alel kaybı sözkonusudur. Bu da p53'ün lokalize olduğu 17. kromozomdaki delesyon veya nokta mutasyonuna bağlıdır. Kontrolsüz proliferasyon sonucu neoplazi gelişir. Kolon, akciğer, meme, karaciğer, prostat, safra kesesi, endometrium, özefagus kanserleri ve lösemi ile ilişkisi bulunmuştur (4, 5, 6). Özellikle gastrik lenfomalar, özefagus, over ve meme kanserlerinde kötü prognozla ilişkilidir (7).

p53 kaybının tiroid karsinogenezindeki yeri kesin belli değildir. Bazı otörler, etkiyi indifferansiye karsinomlar ile sınırlı tutmaktadırlar. Ayrıca tümör progresyonu ile de ilişkili olduğu öne sürülmektedir (5,8). Örneğin, p53 mutasyonları anaplastik karsinomlarda %42'ye varan oranlarda tesbit edilmekte iken diferansiye karsinomlarda ender olarak görülür.

Ki67 proliferasyon belirteci, 395 ve 345 kD moleküler ağırlığında, immünblot analizde çift bant gösteren nonhiston bir proteindir. Hücre siklusunun G2-M fazında en yüksek olmakla birlikte S-G1 fazında da saptanabilir. G0 ve erken G1 fazında ise tesbit edilemez (9, 10). Bu nedenle istirahat halindeki hücreleri siklustakilerden ayırt etmede kullanılır (11). Ki67 proteininin tümör dokusundaki varlığının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi ve miktarının fazlalığının tesbiti tümörün proliferasyon aktivitesinin ölçümünü sağlar.

Bazı çalışmalar göstermiştir ki, proliferasyon belirteci olarak kullanılan Ki67 pozitifliği

daha agresif davranış gösteren tiroid tümörlerinin belirlenmesinde yardımcı olmaktadır. Tiroidin neoplastik ve nonneoplastik lezyonlarının immünreaktivitesini araştıran geniş seri çalışmalarda hem neoplastik hem de nonneoplastik tiroid dokusunda düşük proliferatif aktivite izlenmiştir (10-12).

Bu çalışmada, normal tiroid, fetal tiroid, hiperplastik nodül, folliküler adenom ve papiller karsinomdan oluşan tiroid dokularına p53 ve Ki67 immünhistokimyasal boya çalışmaları uygulanarak, boyanma profil farklılıkları araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarında tanı alan 63 olguya ait cerrahi tiroid materyali çalışmaya alındı. Bu materyallerden 20'si nonneoplastik lezyon, 20'si benign tümör ve 23'ü de malign tümör idi.

Tüm olgulara ait hematoksilen eozin boyalı arşiv preparatları yeniden gözden geçirildi. Bunların arasından seçilen her olguya ait bir adet tümör bloğundan hazırlanan kesite Ki67 (Dako, Predilüe), p53 (Dako, DO7, Predilüe) antikoru ile immunohistokimyasal çalışma uygulandı. Pozitif kontrol olarak yüksek gradlı beyin tümörü kullanıldı.

Ki67 ve p53 için yapılan immunohistokimyasal çalışmada; nükleer boyanma değerlendirmeye alındı. Sayım işlemi p53 için 100'lük büyütmeye tüm kesit taranıp 1 hücre boyanması dahi pozitif kabul edildi. Ki67 için olgularda 100'lük büyük büyütmede tüm kesit tarandı ve en yoğun boyanan 10 büyük büyütme alanındaki (x400) hücrelerin tüm hücrelere oranı verildi (en az 1000 hücre olmak üzere). Olgular Ki67 boyanma yüzdesine göre 4 gruba ayrıldı. Boyanmayan hücreler negatif (0), %1-5 arası boyananlar +1, % 6-10 arasında boyananlar +2, %10 üstünde boyananlar +3 olarak değerlendirildi.

Bu çalışmada istatistiksel analizler Graph-Pad Prisma V.3 paket programı ile yapıldı. Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatis-

Tablo 1: Benign ve malign tiroid lezyonlarının p53 ve Ki67 ile boyanan olgu sayıları

Olgu sayısı	Histolojik tip	p53	Ki67	p
5	Fetal tiroid	0	0	>0,05
5	Normal tiroid	0	0	>0,05
10	Hiperplastik nodül	0	0	>0,05
20	Foliküler adenom	0	3	>0,05
23	Papiller karsinom	6	19	<0,001

Tablo 2: Folliküler adenom ve papiller karsinomda p53 ve Ki67 boyanma dağılımları

Histolojik tip	p53		Ki67	
	+	-	+	-
Foliküler adenom	0	20 (%100)	3 (%15)	17(%85)
Papiller karsinom	6 (% 26,1)	17 (%73,9)	19 (%86,9)	4 (%13,1)

tiksel metodların (ortalama, standart sapma) yanı sıra nitel verilerin karşılaştırmalarında ki-kare ve Fisher gerçeklik testi kullanıldı. Sonuçlar, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde, %95'lik güven aralığında değerlendirildi.

BULGULAR

Fetal tiroid, normal tiroid ve hiperplastik nodül olguları p53 ve Ki67 ile boyanma göstermedi. Folliküler adenom olgularının 3'ünde Ki67 için +1 boyanma görülürken, p53 için boyanma saptanmadı.

Çalışmaya alınan 63 olgunun p53, Ki67 boyanma özellikleri tablo 1'de özetlenmektedir. Papiller karsinomda p53 pozitif olgularda Ki67 boyanma oranı anlamlı derecede yüksek çıkmıştır ($p < 0,001$).

Ki67 boyanma oranları incelendiğinde, papiller karsinom olgularının 19'u boyanırken, folliküler adenom olgularının 3'ü boyanmıştır. Ki67 ile nükleer boyanma gösteren 19 olgunun, 13'ü +1; 6'sı ise +2 nükleer boyanma yaygınlığı göstermektedir. Papiller karsinomda Ki67 ile boyanma oranı folliküler adenomdan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0,0001$). Papiller karsinomlu olguların %86,9'u, folliküler adenomların ise %15'i Ki67 ile boyanmıştır (Tablo 2).

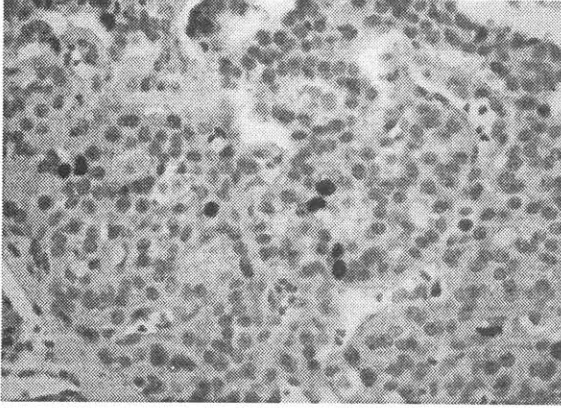
p53 boyanma oranları incelendiğinde, folliküler adenomda hiç boyanma görülmezken, papiller karsinomlu olguların 6'sında boyanma izlendi. Papiller karsinomda p53 ile boyanma oranı folliküler adenomdan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$) (Tablo 2).

TARTIŞMA

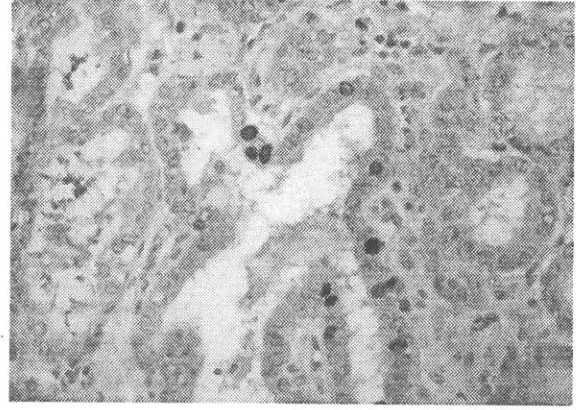
Ki67 proliferasyon belirteci ile benign ve malign tiroid lezyonlarında boyanma farklılıkları birçok çalışmada karşılaştırılmıştır.

Papiller karsinomlar genel olarak proliferatif aktiviteleri düşük olan iyi diferansiye tiroid maligniteleri grubunda yer alan tümörlerdir. Tiroidin diğer benign lezyonlarının da proliferatif aktiviteleri düşüktür (9, 13).

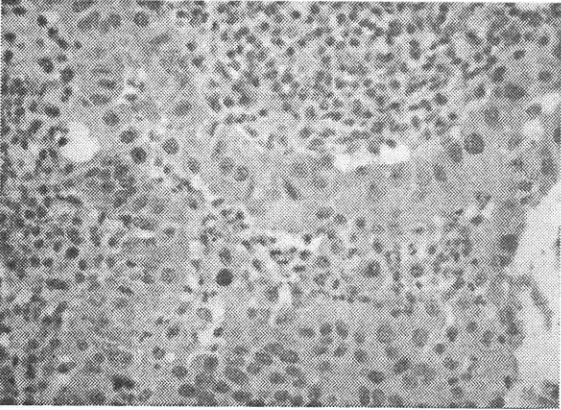
Wallin (10) 32 olgudan oluşan çalışmasında Ki67 boyanma oranını, benign tiroid tümörlerinde %0-3,1; malign tiroid tümörlerinde %0,2-3,9 arasında bulmuştur. Bu durumu tiroidin hem neoplastik, hem nonneoplastik lezyonlarının düşük proliferatif aktiviteli oluşuna bağlamıştır. Medüller karsinom, papiller karsinom, folliküler adenom, toksik guatr, nontoksik guatr ve normal tiroid dokularını içeren serilerinde; medüller kanserde daha yüksek Ki67 boyanma yüzdesi elde ederken, bunu papiller karsinom, folliküler adenom daha düşük boyanma yüzde-



Resim 1: Folliküler adenom (Ki 67 X400)



Resim 2: Papiller karsinomda Ki 67 ile nükleer boyanma (Ki 67 X400)



Resim 3: Papiller karsinomda p53 ile nükleer boyanma (p53 X400)

leri ile izlemektedir. Bu lezyonları nodüler guatr ve normal tiroid dokuları takip etmektedir. Rigaud'un (11) 31 neoplastik ve nonneoplastik tiroid lezyonu üzerinde yaptığı çalışmada nonneoplastik olan tüm olgularda ve papiller karsinomlarda Ki67 ile boyanma izlenmemiştir. Kato'nun (12) 232 tiroid lezyonunu içeren çalışmasında normal ve adenomatöz guatra göre neoplastik lezyonlarda daha yüksek proliferatif indeks bulunmuştur. Malign tiroid tümörlerinde, adenomlara göre daha yüksek seviyeler bulunmuştur. Ludvikova'nın (14) 215 tiroid tümörüne Ki67 ile uyguladığı immunohistokimyasal çalışmada, malign tiroid tümörlerinde, özellikle onkositik hücrelerden zengin olanlarda; adenomlara göre daha yüksek proliferatif indeks izlenmiştir .

Çalışmamızda Ki67 normal tiroid, fetal tiroid, hiperplastik nodül olgularında boyanma göstermezken, folliküler adenom olgularının sadece 3 ünde, papiller karsinomlu olguların ise 19'unda boyanma göstermiştir. Boyanma yoğunluğu en fazla % 6-10 arasındadır. Bu durum genel olarak proliferasyonun düşük oluşuna bağlanmıştır. Bu bulgularla Ki67 indeksi papiller karsinomlu olgularda anlamlı ölçüde yüksek çıkmıştır. Sonuç olarak papiller karsinomun nonneoplastik lezyonlara göre daha yüksek proliferasyona sahip olduğu söylenebilir.

p53 insan kanser biyolojisinde oldukça fazla çalışılmış genlerden biridir. Fonksiyonlarındaki bozukluk neoplastik hücrelerin daha uzun süreli yaşamalarına, diğer onkogenler ile meydana gelen mutasyonel değişikliklere açık olmalarına neden olur (1-6, 15).

Pollina'nın (16) normal tiroid, fetal tiroid, adenom, iyi diferansiye, kötü diferansiye, indifferansiye ve medüller tiroid kanseri ile yaptığı çalışmada p53 değişikliklerinin, daha çok kötü diferansiye tiroid karsinomlarının indifferansiye tiroid kanserlerine dönüşümde etkili oldukları sonucuna varılmıştır. Buna göre p53'ün tiroid moleküler karsinogenezindeki rolünü anaplastik karsinoma dönüşüm olarak belirlemişlerdir. Benzer şekilde biyolojik olarak daha kötü olan tiroid malignitelerinde (indifferansiye, kötü diferansiye), p53 pozitifliğinin daha yüksek oranda olduğunu belirtir çalışmalar vardır (5, 6). Czyz'in (3) 11 folliküler karsinom, 49 follikü-

ler adenomdan oluşan serilerinde 49 adenomun sadece 2'sinde pozitif boyanma elde edilmiştir. Nasir'in (17) benign ve malign folliküler neoplazilerden oluşan serisinde, p53 ile folliküler karsinomlarda, folliküler adenomlara göre daha kuvvetli nükleer boyanma izlenmiştir.

SONUÇ

Bu çalışmada diğer yapılan çalışma sonuçlarına benzer şekilde, normal, fetal ve hiperplastik tiroid dokusu ile folliküler adenomdan oluşan benign neoplastik lezyonlarda boyanma saptanmazken, 23 papiller karsinomun 6'sında

boyanma izlenmiştir. p53 ile boyanan olgularda, Ki67 proliferatif aktivitesi daha yüksektir. Papiller karsinomdaki p53 immünreaktivitesi folliküler adenomdan anlamlı ölçüde yüksektir. Bu bulgularla benign lezyonlarda p53 immünreaktivitesi olmadığı sonucuna varılabilir.

Papiller karsinomların, genel olarak düşük proliferasyona sahip tümörler olmakla birlikte, benign tiroid tümörleri ve normal tiroid dokusuna göre daha proliferatif olduğu ve p53 gen ekspresyonunun varlığı gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Levine AJ, Momand J, Finlay A: p53 tumour suppressor gene. *Nature*, 1991; 351: 453-456
2. Farid NR, Shi Y, Zou M: Molecular basis of thyroid cancer. *Endocrine Reviews*, 1994;15: 202-232
3. Czyz W, Joensuu H, Pylkkanen L, Klemi P: p53 protein and DNA content in follicular neoplasm of the thyroid gland. *Journal of Pathology*, 1994; 174: 267-274
4. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Haris CC: Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research*, 1994; 54: 4855-4878
5. Dobashi Y, Sakamoto A, Sugimura H, et al.: Overexpression of p53 as a possible prognostic factor in human thyroid carcinoma. *American Journal of Surgical Pathology*, 1993; 17: 375-381
6. Zou M, Shi Y, Farid N: p53 mutations in all stages of thyroid carcinomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1993; 77: 1054-1058
7. Ulukuş EÇ, Canda MŞ: Tiroid papiller karsinomlarında Ki 67, bcl-2 ve P 53 immünreaktivitelerinin klinikopatolojik prognostik faktörler ile ilişkisi. *Türkiye Ekopatoloji dergisi*, 2001; 7: 98-104
8. Soares P, Teijeiro J, Simoes M: Immunohistochemical detection of p53 in differentiated, poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid. *Histopathology*, 1994; 24: 205-210
9. Erickson LA, Jin L, Goellner JR, Lohse C, et al.: Pathologic features, proliferative activity, and cyclin D1 expression in hürthle cell neoplasms of the thyroid. *Modern Pathology*, 2000; 13: 186-192
10. Wallin G, Backdahl M, Christensson B, et al.: Nuclear protein content and Ki67 immunoreactivity in nonneoplastic and neoplastic thyroid cells. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 1992; 14: 296-303
11. Rigaud C, Bogomoletz W. V: Apparent lack of usefulness of monoclonal antibody Ki67 in thyroid tumour pathology. *Pathology Research and Practice*, 1991; 187: 198-200
12. Katoh R, Bray CE, Suzuki K, et al.: Growth activity in hyperplastic and neoplastic human thyroid determined by an immunohistochemical staining procedure using monoclonal antibody MIB-1. *Human Pathology*, 1995; 26: 139-146
13. Siironen P, Nordling S, Louhimo J, Haapiainen R, Haglund C. Immunohistochemical expression of Bcl-2, Ki67, and p21 in patients with papillary thyroid cancer. *Tumour Biology*, 2005;26:50-56
14. Ludvíkova M, Holubec L Jr, Ryska A, Topolcan O. Proliferative markers in diagnosis of thyroid tumors: a comparative study of MIB-1 and topoisomerase II-a immunostaining. *Anticancer Research*, 2005; 25:1835-1840.
15. Goto A, Sakamoto A, Machinami R: An immunohistochemical analysis of cyclin D1, P53 and P 21waf1/cip1 proteins in tumors originating from the follicular epithelium of the thyroid gland. *Pathology Research and Practice*, 2001; 197: 217-222
16. Pollina L, Pacini F, Fontanini G, et al.: Bcl 2, p53 and proliferating cell nuclear antigen expression is related to the degree of differentiation in thyroid carcinomas. *British Journal of Cancer*, 1996; 73: 139-143
17. Nasir A, Catalano E, Calafati S, et al: Role of p53, CD44V6 and CD57 in differentiating between benign and malignant follicular neoplasms of the thyroid. *In Vivo*, 2004;18:189-195