



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIĞIR DERİ PAPİLLOMUNDA P53, PERP VE E-CADHERİN
EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

Vet. Hek. Bilal ÜLGENOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Zafer ÖZYILDIZ

BURDUR - 2019

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIĞIR DERİ PAPİLLOMUNDA P53, PERP VE E-CADHERİN
EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

Vet. Hek. Bilal ÜLGENOĞLU

YÜKSEKLİSANS TEZİ

VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Zafer ÖZYILDIZ

Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0428YL-17 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR - 2019

KABUL ve ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bilal ÜLGENOĞLU tarafından Prof. Dr. Zafer ÖZYILDIZ yönetiminde hazırlanan "Sığır Deri Papillomunda P53, Perp ve E-Cadherin Ekspresyonlarının Araştırılması" başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Veteriner Patoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı Tarihi 29.08.2019

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN
Başkan

Doç. Dr. Hikmet KELEŞ
Jüri

Prof. Dr. Zafer ÖZYILDIZ
Jüri

ONAY

Bu tez, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu 02.10.2019 ve 40.. sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Doğa TEMİZSOYLU
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



TEŞEKKÜR

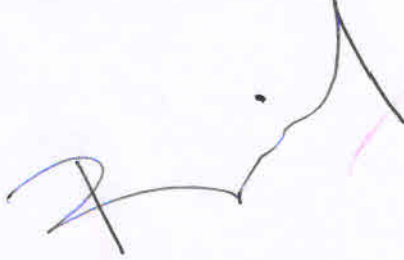
Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, 3 yıl boyunca değerli bilgilerini benimle paylaşan, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım saygıdeğer danışman hocam; Prof. Dr. Zafer ÖZYILDIZ'a, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen ve aynı zamanda evleneceğim hayat arkadaşım Vildan YAZAR'a, çalışma süresince bana yardımcı olan yüksek lisans öğrencisi Leyla Elif Özgü AYÖZGER'e ve Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



ETİK BEYAN

Sığır Deri Papillomunda P53, PERP ve E-CADHERİN Ekspresyonlarının Araştırılması başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Zafer ÖZYILDIZ danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

29.08.2019
Bilal ÜLGENOĞLU



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN SAYFASI	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vi
TABLolar	viii
SİMGELELER ve KISALTMALAR	ix
TÜRKÇE ÖZET	x
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Genel Bilgiler	1
1.1.1. P53	2
1.1.2. Kaderinler	7
1.1.3. PERP	9
2. GEREÇ ve YÖNTEM	11
2.1. Histopatolojik Yöntemler	12
2.1.1. Histokimyasal yöntem	12
2.1.2. İmmunohistokimyasal yöntem	13
2.2. Semikantitatif Analiz	13
2.3. İstatistiksel Analiz	14
3. BULGULAR	15
3.1. Makroskobik Bulgular	15
3.2. Histopatolojik Bulgular	17
3.3. İmmunohistokimyasal Bulgular	21
3.3.1. Anti p53 Boyamalar	21
3.3.2. Anti E-cadherin Boyamalar	25
3.3.3. Anti PERP Boyamalar	28
3.4. İstatistiksel Analiz	31
4. TARTIŞMA	34
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	37
KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	42

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	TP53, kimyasal ajanlar ve iyonize radyona bağlı olarak gelişen DNA çift zincir kırıkları, viral enfeksiyonlar veya nukleotid imbalansı gibi hücresel stres durumları ve onkogenik işleve bağlı gerçekleşen hücre çoğalması gibi genomun birçok çeşit hasarına karşı hücresel cevap oluşmasında rol almaktadır (Schulz, 2007)	4
Şekil 1.2.	P53 proteini üzerinde en sık mutasyon tanımlanan sıcak bölgeler amino asit numaralarıyla gösterilmiştir (Prives ve Manfredi, 1993).	7
Şekil 3.1.	Baş boyun bölgesinde (A) ve art. Cubiti’de (B) lokalize olmuş papillomlar.	16
Şekil 3.2.	Meme ucundan ekstirpe edilen bir papillomun dış görünüşü (A) ve kesit yüzünün görünümü (B)	16
Şekil 3.3.	Tümöral kitle, histopatolojik görünüm; çok katlı yassı epitelde akantotik (A) ve hiperkeratotik (H) değişiklikler. H&E, X40, barr: 200 µm.	18
Şekil 3.4.	Epidermiste akantotik değişiklikler, yüzeye yakın konumda hidropik-balonumsu dejenerasyon ve spongioz değişiklikler (Kalın ok), makro vezikül oluşumu ve içerisinde pembe homojen materyal birikimi (İnce büyük başlı ok), kuşgözü formasyonu (ince ok). H&E, X100, Barr: 200 µm.	19
Şekil 3.5.	Epidermiste bazal membrana yakın bölgelerde spongiotik ve apoptotik hücre değişiklikleri (yıldız) ile dermisteki venlerde vazodilatasyon (raptiye). H&E, X50, 100µm Barr.	20
Şekil 3.6.	Tümör parankiminde Anti-P53 kuvvetli immun-pozitif alanlar (yıldız). ABC-P, X100, Barr: 100µm.	22
Şekil 3.7.	Tümör parankiminde dejeneratif bölgelerde Anti-P53 kuvvetli immun-pozitif alanlar (yıldız). ABC-P, X40, Barr: 200µm.	23
Şekil 3.8.	Tümör parankiminde dejeneratif bölgelerde Anti-P53 kuvvetli immun-pozitif alanlar (yıldız). ABC-P, X100, Barr: 100µm.	23
Şekil 3.9.	Tümör stromasında Anti-P53 immun-pozitif boyanan alanlar (yıldız) fibroblast ve fibrositler (oklar). ABC-P, X100, Barr: 100µm.	24
Şekil 3.10.	Normal deri, Anti-P53 negatif boyanmalar, ABC-P X40, Barr: 200µm.	24
Şekil 3.11.	Tümör parankiminde dejeneratif bölgelerde Anti-E-cadherin kuvvetli immun-pozitif alanlar (oklar). ABC-P, X40, Barr: 200µm	26
Şekil 3.12.	Tümör parankiminde dejeneratif bölgelerde Anti-E-cadherin kuvvetli immun-pozitif alanlar (yıldızlar). ABC-P, X40, Barr: 200µm	26
Şekil 3.13.	Tümör stromasının Anti-E-cadherin immun-pozitif boyanan alanlar damar duvarlarında (kalın oklar), fibroblast ve fibrositler (ince oklar). ABC-P, X100, Barr: 100µm.	27

Şekil 3.14.	Normal deri, epitel hücreleri arasında ve sitoplazmalarında Anti-E-cadherin hafif immun-pozitif boyanmalar, ABC-P A:X40, Barr: 100µm, B: Yakın görünüm, X400, Barr: 20µm.	27
Şekil 3.15.	Tümör parankiminde dejeneratif bölgelerde Anti-PERP kuvvetli immun-pozitif alanlar (yıldızlar). ABC-P, X40, Barr: 200µm.	29
Şekil 3.16.	Tümör parankiminde dejeneratif bölgelerde Anti-PERP hafif immun-pozitif alanlar, yakın görünüm (yıldızlar). ABC-P, X100, Barr: 100µm.	29
Şekil 3.17.	Normal deri, Anti-PERP negatif boyanmalar, ABC-P X40, Barr: 200µm.	30



TABLÖLAR

Tablo 2.1.	Çalışmada kullanılan materyallerin fenotipik özellikleri	12
Tablo 3.1.	Histopatolojik değişikliklerin skor tablosu. “-“ yok; “+” hafif; “++” orta; “+++” şiddetli.	17
Tablo 3.2.	Anti-P53 immunohistokimyasal boyamaların semikantitatif analizi	25
Tablo 3.3.	Anti-E-cadherin immunohistokimyasal boyamaların semikantitatif analizi	28
Tablo 3.4.	Anti-PERP immunohistokimyasal boyamaların semikantitatif analizi	31
Tablo 3.5.	Histopatolojik skorların istatistik analiz sonuçları	32
Tablo 3.6.	İmmunohistokimyasal skorların istatistik analiz sonuçları	33

SİMGELER ve KISALTMALAR

ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and rad3-related protein
Chk2	Checkpoint kinase 2
DAB	3,3'-diaminobenzidine
EMT	Epitelyal-mezenkimal geçiř
GADD45	Growth arrest and dna damage inducible 45
MDM2/HDM2	Murine/human double minute 2
MET	Mezenkimalden epitelyal geçiř
MP53	Mutant p53
P53	Tümör protein 53
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PERP	P53 apoptosis effector related to pmp-22
PUMA	P53 up-regulated modulator of apoptosis
RPA	Replicating protein antigen
TA	Trans aktivatör
TBP	Tata binding protein
WP53	Wild type p53
XPB	Xeraoderma pigmentosum group b dna helicase

ÖZET

Sığır Deri Papillomunda P53, Perp Ve E-Cadherin Ekspresyonlarının Araştırılması

Sığırlarda deri papillomu sıkça görülen bir hastalıktır. Kitlelerin benign karakterde olmasına karşın zaman zaman multiple seyretmesi ve sık sık nüks etmesi tedavi ve hayat konforu açısından zorluklara neden olmaktadır. Hastalığın teşhisi, patogenezi ve tedavisinde oldukça fazla çalışma yapılmasına rağmen gelişen bilim ve teknoloji ile yeni belirteç ve yöntemlerin bulunması, bu hastalık hakkında bilinenlerin yeniden gözden geçirilmesi ve bilinmeyen yönlerin açığa çıkartılması açısından önemlidir.

Yapılan çalışma ile P53, PERP ve E-cadherin aktivasyonlarının sığırlarda deri papillomu oluşumundaki patogenetik mekanizmalar ile ilişkileri ortaya çıkarılmış olacaktır. Yapılan literatür taramasında sığır deri papillomunda P53, PERP ve E-cadherin salınımlarının beraberce incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yönüyle alanında öncü bir çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Deri papillomu, P53, PERP, E-cadherin, Sığır

ABSTRACT

Investigation of P53, Perp and E-Cadherin Expressions in Bovine Skin Papilloma

Skin papilloma is a common disease in cattle. Although the masses have a benign character, their multiple recurrence and frequent recurrences cause difficulties in treatment and life comfort. Although there is a lot of study in the diagnosis, pathogenesis and treatment of the disease, the development of new indicators and methods with the developing science and technology is important in terms of revising the known and known aspects of this disease.

In this study, the relationships between P53, PERP and E-cadherin expressions with pathogenetic mechanisms in skin papilloma formation is revealed. In the literature review, we did not find any study on P53, PERP and E-cadherin oscillations in cattle skin papilloma. This study is a preliminary to other studies in this field.

Keywords: Skin papilloma, P53, PERP, E-cadherin, Cattle

1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

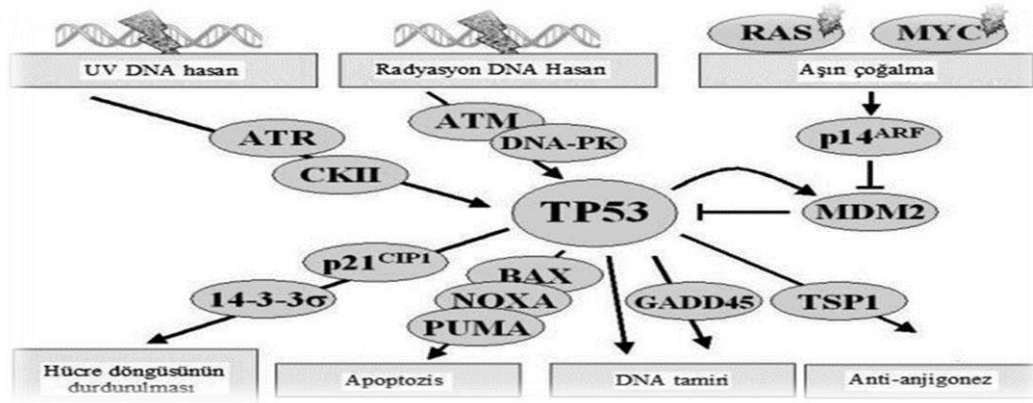
Sığır deri papillomu genellikle sığırların derisinde Papova virusların oluşturduğu benign karakterli solid veya multiple olarak görülebilen bir tümördür. Papillomalar diğer hayvan türlerinde de görölse de sığırlarda daha sık olarak görülmektedir. Çoğunlukla kendiliğinden regrese olur. Bazen kalıcı olabilir, bazı durumlarda ise çevresel yardımcı faktörlerin de etkisiyle malignant türdeki yassı hücreli kanserlere de dönüşebilir (Hargis, 1995). Papilloma benign bir tümör olması dolayısıyla oluşum mekanizmasında (tümörigenezis) hücreler arası bağlantıların, PERP (p53 apoptosis effector related to pMP-22), E-Cadherin gibi desmozom proteinlerinin ve P53 gen aracılı apoptozis ve homeostazisin önemli rolleri vardır. P53 gen proteini, PERP ve E-cadherin miktarlarının azalması tümör oluşumunu ile yakın ilişki içerisindedir (Bieging ve ark., 2014; Kong ve ark., 2013). P53, 1979 yılında tanımlanan, 1989 yılına kadar tümör gelişimini teşvik edici olarak bilinen bir protein olmuştur. Daha sonra p53ün mutant şeklinin bu yönde çalıştığı keşfedilmiştir (Varley ve ark., 1997; Velculescu ve El-Deiry, 1996). p53 proteininin tümör baskılayıcı olarak çalıştığını ancak bu proteinin mutant p53ün bir versiyonu olduğu ortaya çıkarılmış, TP53 (Tumor Protein 53) olarak isimlendirilmiştir (Varley ve ark., 1997). Bu bilgiler ışığında iki farklı işlevi belirlenmiş p53 üzerine ciddi miktarda araştırmalar yapılmış ve 1993 yılında “yılın molekülü” seçilmiştir. p53 geni ve proteinine yönelik uluslararası bilimsel toplantılar düzenlenerek p53 veritabanı oluşturulmuş ve gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen bulgular bu veritabanlarına yüklenmiştir (Prives ve Manfredi, 1993). P53 proteini ile alakalı bu çalışmalar p53ün hücreler işlevinin ortaya konmasını, proteinin hücre döngüsünün kontrol edilmesi, gen ifadesinin düzenlenmesi, yaşlanma ve programlı hücre ölümü gibi birçok hücreler olayda rol aldığıın gösterilmesini sağlamıştır (Haris, 1996). p53’ün hücrenin yaşaması ya da ölmesi ile ilişkili durumlarda ana faktörlerden biri olduğu görülmüştür (Haris, 1996; Velculescu ve El-Deiry, 1996). p53’ün herhangi bir nedenle işlevini yapamaması, mutasyon ya da delesyon gibi durumlarda ortadan kalktığında, hücre ve organizmanın nasıl etkilendiği, kalıtımla aktarılan TP53 mutasyonları ile karakterize

otozomal dominant hastalıklarda, p53'ten yoksun farelerde ve Saos-2 gibi hücre hatlarını üzerine çalışılmıştır (Lee, 1991; Lin ve ark., 2009; Varley ve ark., 1997). TP53'ün mutasyonu sonucu oluşan otozomal dominant bir hastalık olan Li-Fraumeni Sendromunda hastaların gelişimleri normaldir ancak meme kanseri, yumuşak doku sarkomları, beyin tümörü, akut lösemi ve adrenal kortikal karsinom gibi değişik tipteki kanserlerin gelişimine yatkın olmaktadır (Varley ve ark., 1997). TP53 geninden yoksun (p53^{-/-}) olan farelerde de gelişimsel açıdan herhangi bir anomali olmadığı ancak bu farelerin de kanser gelişimine yatkın oldukları çalışmalarda gösterilmiştir (Lin ve ark., 2009). Saos-2 osteosarkoma hücre hattında gerçekleştirilen ve her iki p53 allelinde de delesyon olan çalışmalarda, normal şartlarda p53'ün transkripsiyon faktörü olarak çalışmasıyla transkripsiyonu gerçekleştiren p21 proteininin bu hücrelerde, p53 olmamasına rağmen transkripsiyonunun sağlandığı belirtilmiştir (Lee, 1991). p53'ten yoksun fareler, Li-Fraumeni sendromlu hastalar ve Saos-2 hücrelerindeki çalışmalar, hücre içerisindeki p53 işlevlerinin, p53 dışında başka proteinlerce karşılanıyor olabileceğini düşündürmüştür. 1997 ve 1998 yıllarında yapılan araştırmalarda insan genomunda TP53'e homoloji gösteren ve protein ürünleri p53 ile benzer işlevlere sahip olan iki farklı gen daha olduğu bulunmuştur (Mills ve ark., 1999; Moll ve Slade, 2004). p63 ve p73 olarak isimlendirilmiş bu proteinlerin her ikisinde de p53'ün N-ucu transaktivasyon bölgesi, merkezi DNA-bağlanma bölgesi ve C-ucu oligomerizasyon bölgesi ile yüksek oranda benzerlik gösteren bölgeler bulunmaktadır (Mills ve ark., 1999). Ek olarak, her iki protein de p53-duyarlı promotorları uyarabilmekte ve hücrede fazla ifade edilmeleri durumunda programlı hücre ölümünü de tetikleyebilmektedirler (Kaelin, 1999). Bu üç gen belirgin olarak benzer intron/ekzon düzenine sahiptir ancak p63 ve p73 proteinleri p53'ten farklı olarak daha karmaşık farklı birleşme (alternative splice form) türevleri oluşturmaktadırlar (Kaelin, 1999).

1.1.1. P53

p53 proteini transkripsiyon faktörü işlevine sahip 393 amino asitten oluşan bir proteindir (Chang ve ark., 2001). p53'ün 17. kromozomunun kısa kolu üzerine yaklaşık 20 kb'lık bir veri kodlanmış ve 11 ekzondan oluşan bir gen tarafından oluşturulmaktadır (Varley ve ark., 1997). p53 proteini DNA tamiri, hücre döngüsünün

kontrolü, genomik kararlılığın sağlanması, kromozom ayrılmasının düzenlenmesi, gen ifadesinin düzenlenmesi, yaşlanma ve programlı hücre ölümü gibi birçok hücrel olayda rol almaktadır (Harris, 1996). p53, bu işlevlerini ya transkripsiyon faktörü olarak ilgili genlerin transkripsiyonlarını düzenleyerek ya da diğer proteinler ile veya DNA ile doğrudan etkileşerek gerçekleştirmektedir (Harris, 1996). p53, hücre döngüsünün G0/G1 evresinde rol alan birçok siklin bağımlı kinazın işlevini engelleyen p21 proteininin ifadesini, p21WAF2/Cip1 geninin transkripsiyonunu uyarak düzenlemekte ve böylece p21 proteini aracılığı ile hücre döngüsünü G1 aşamasında durdurmaktadır (Gabriel, 2007; Harris, 1996). p53 ayrıca, mitoz bölünme için gerekli proteinleri kodlayan c-myc ve c-fos gibi genlerin transkripsiyonlarını düzenleyen E2F transkripsiyon faktörü ile fiziksel olarak etkileşerek hücre döngüsünün G2 evresinde durdurulmasında da rol almaktadır (Bunz, 1998; Gabriel, 2007; Schulz, 2007). p53, DNA tamiri ve DNA sentez mekanizmasında rol alan PCNA (proliferating cell nuclear antigen), GADD45 (growth arrest and DNA damage inducible 45) proteinlerini ve programlı hücre ölümünde rol alan PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis), Noxa (Latin for “damage”), Bax (Bcl-2-associated X protein) ve Fas gibi proteinlerin transkripsiyonlarını da düzenlenmektedir (Şekil 1.1.) (Harris, 1996). p53, TBP (TATA Binding Protein)’ye bağlanarak üzerinde TATA dizisi bulunduran Bcl-2 gibi birçok genin transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol almaktadır (Harris, 1996). p53 ayrıca DNA replikasyonu sırasında, replikasyonu başlatıcı bölgelere doğrudan bağlanarak replikasyon çatallanmasını engeller ve böylece transkripsiyondan bağımsız bir mekanizma ile replikasyonu baskılar (Harris, 1996).



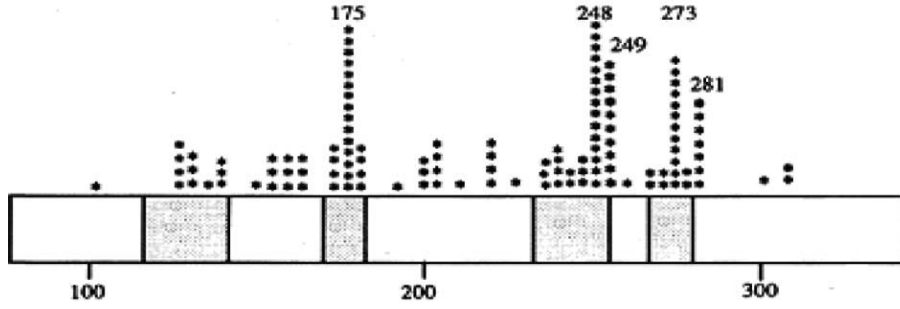
Şekil 1.1. TP53, kimyasal ajanlar ve iyonize radyona bağlı olarak gelişen DNA çift zincir kırıkları, viral enfeksiyonlar veya nükleotid imbalansı gibi hücresel stres durumları ve onkogenik işleve bağlı gerçekleşen hücre çoğalması gibi genomun birçok çeşit hasarına karşı hücresel cevap oluşmasında rol almaktadır (Schulz, 2007).

P53 proteini, RPA (Replicating Protein Antigen) gibi DNA sentezinde rol alan proteinler ve XPB (Xeroderma Pigmentosum Group B DNA helicase), XPD (Xeroderma Pigmentosum Group D DNA helicase), p62 ve topoizomerez gibi DNA tamirinde rol alan proteinlerle de etkileşim halinde çalışmaktadır (Haris, 1996). Bu gibi görevleri dışında, DNA’da gerçekleşen çift zincir kırılmaları ya da telomer hasarları gibi durumlarda da homo-tetramer yapılar halinde doğrudan DNA’ya bağlanarak, DNA sarmalının çözülmesine engel olmaktadır (Tan ve Luo, 2009).

P53 proteini işlevsel rollerine bağlı olarak 3 bölüme ayrılarak incelenebilir (Prives ve Manfredi, 1993). Proteinin N-ucu, Trans Aktivatör (TA) bölge olarak isimlendirilmekte ve p53 protein transkripsiyonunu DNA’ya bağlanarak başlatmaktadır (Kaelin, 1999; Prives ve Manfredi, 1993). Bu bölge aynı zamanda p53 proteininin yarılanma ömrünü de belirler. p53 proteininin yarıömrü normal koşullarda 20 dakika civarındadır ancak N-ucuna MDM2/HDM2 (Murine/Human Double Minute 2) proteini bağlanarak p53’ün proteozomlara yönlendirilmesine ve orada parçalanmasına, sonuç olarak yarıömrünün kısalmasına neden olmaktadır (Meek, 2009; Schulz, 2007). DNA hasarı veya hücresel stres gibi bir nedenle aktifleşen ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein), Chk2 (Checkpoint kinase 2) proteinleri, p53 proteininin N-ucundaki amino asitlerin fosforillenmesine neden olur ve bunun sonucunda MDM2/HDM2 proteininin

p53'e bağlanması engellenerek p53 proteininin kararlılığı sağlanmış olur (Gabriel, 2007; Kaelin, 1999; Prives ve Manfredi, 1993). p53 kararlılığının sağlanması amacıyla MDM2'nin p53'den uzaklaştırılmasında INK4 geninin alternatif ürünü olan p14ARF de rol oynamaktadır (Gasco ve ark., 2002). p14ARF, MDM2/HDM2'ye bağlanarak bu proteinin p53'ten ayrılmasına neden olur (Gasco ve ark., 2002; Schulz, 2007). Hücrede bir hasar gerçekleştiğinde p53 proteini, tamiri mümkün hasarlarda hücre döngüsünü durdurarak ya da tamiri mümkün olmayan hasarlarda programlı hücre ölümünü sağlayarak çalışmaktadır (Haris, 1996; Schulz, 2007). p53 proteininin C- ucu oligomerizasyon bölgesi olarak adlandırılmaktadır (Moll ve Slade, 2004). Bu bölge aracılığı ile p53 proteini diğer proteinler ile fiziksel olarak ilişki kurarak hetero-dimer yapılar oluşturmaktadır (Prives ve Manfredi, 1993). p53 proteini gerek transkripsiyon faktörü olarak gerekse DNA çift zincir kırılması ya da telomer hasarları gibi durumlarda DNA'ya eş-dörtlü yapılar (homo-tetramer) halinde doğrudan bağlanmaktadır (Tan ve Luo, 2009). p53, eş dörtlü yapılar oluşturmaması durumunda DNA ile ilişki kuramayacak ve başta transkripsiyon faktörü işlevi olmak üzere DNA ile doğrudan ilişkili olan diğer işlevlerini yerine getiremeyecektir. p53 proteinin C- ucu hetero yapılarla birlikte homo yapıların oluşabilmesinde de özellikle önemlidir ve bu bölgenin kararlılığı lizin asetilasyonu ya da serin fosforillenmesi ile düzenlenmektedir (Gasco ve ark., 2007). p53 proteinin N-ucu ile C-ucu arasındaki bölge, p53 proteinin DNA'ya bağlanabilmesinde rol almaktadır (Prives ve Manfredi, 1993; Tan ve Luo, 2009). p53'ün hem transkripsiyon faktörü olarak işlev göstermesinde hem de transkripsiyondan bağımsız mekanizmalarla DNA ilişkili işlevlerini gerçekleştirmesinde bu bölge oldukça önemlidir (Prives ve Manfredi, 1993). p53 geninin DNA bağlama bölgesini kodlayan dizilerinde oluşan mutasyonlar genellikle onkogenik sonuçlar meydana getirmektedir (Prives ve Manfredi, 1993; Tan ve Luo, 2009). İstatistiksel olarak; insanlardaki kötü huylu tümörlerin %50'sinde p53 mutasyonları görülmekte ve bu mutasyonların %95'i p53 proteininin DNA'ya bağlandığı bölgede gerçekleşmektedir. Gerçekleşen bu mutasyonların %75'i tek nükleotid değişimi şeklindeki mutasyonlardır (Ho ve ark., 2006; Meek, 2009; Tan ve Luo, 2009). p53 proteininin C-ucunda, proteini nükleusa yönlendiren 3 tane NLS (nuclear localization sequence) bölgesi bulunmaktadır (Prives ve Manfredi, 1993). p53 proteini kristal yapı incelemeleri p53 proteinin yapısını ve DNA ile nasıl bir düzlemde ilişki

kurduğunu ortaya koyduğu gibi p53 geninde gerçekleşen mutasyonların rollerini de ortaya koymuştur (Ho ve ark., 2006). Bu çalışmalar sonucunda p53 proteininde tanımlanmış olan mutasyonların %20'sinin proteinin DNA'ya bağlandığı bölgede bulunan 2 arjinin aminoasidinin değişimiyle gerçekleştiği belirlenmiştir (Devlin, 2006). DNA-p53 protein kristal yapısının incelenmesi, bu arjininlerin, p53 proteini ile DNA arasındaki bağın oluşmasında önemli olduğunu göstermiştir (Devlin, 2006; Ho ve ark., 2006). 248. konumda bulunan arjinin amino asidinin, timin nükleotidindeki oksijen ile ve adenin nükleotidinin halka yapısında bulunan nitrojen ile hidrojen bağı oluşturulmasında rol aldığı gösterilmiştir (Devlin, 2006; Ho ve ark., 2006). Bu bölge, p53 proteinin, DNA'nın küçük oluşuna bağlanmasında önemlidir ve burada gerçekleşen mutasyonlar proteinin DNA'ya bağlanabilme özelliğini değiştirmektedir (Devlin, 2006). Değişik tümörlerde gerçekleştirilen p53 proteini kristal yapısı incelemeleri ve bu proteinleri kodlayan dizilerin DNA dizi analizi ile ortaya konulması, p53 geni üzerinde kanser türüne özgü mutasyonların oluşmasına imkan veren sıcak bölgelerin varlığını göstermiştir (Devlin, 2006; Varley ve ark., 1997). Bu sıcak bölgelerdeki mutasyonlar p53 proteininin DNA'ya tutunmasında rol alan amino asit kodonlarında değişimlere neden olarak proteinin DNA'ya bağlanabilmesini etkilemektedir (Şekil 1.2) (Devlin, 2006). Bahsedilen kodonlardan 175, 248, 273 ve 282. kodonlarda gerçekleşen mutasyonlar sıklıkla kolon kanserinde, 273. kodon mutasyonları beyin tümörlerinde, 249. kodon mutasyonları karaciğer kanserlerinde, 242 ve 273. kodon mutasyonları akciğer kanserlerinde, 172, 213 ve 248. kodon mutasyonları Burkitt's Lenfoma'da ve 144, 156 ve 248. kodon mutasyonları da pankreas kanserlerinde görülmektedir (Bieging ve ark. 2014; Prives ve Manfredi, 1993; Yamaguchi ve ark.1999). P53 genindeki inaktivasyon, hasar ya da geçirdiği mutasyon tümör oluşumuna neden olmaktadır (Kishore ve ark., 1996; Levine ve ark., 2004; Marques ve ark., 2005). Bu nedenle yapılan araştırmalarda wild type (W) ve mutant type (M) olmak üzere iki tip P53 proteininden bahsedilmektedir. Bu nedenle dokunun hücre üremesi, dolayısıyla tümör oluşumuna gösterdiği direncin belirleneceği durumlarda "W" tipi, tümör oluşumunun belgeleneceği durumlarda ise "M" tipi P53 proteininin salınımlarına bakılmaktadır (Levine ve ark., 2004). Bu çalışmada sıgır deri papillomlarında tümörün oluşumunu belgeleyen P53 markerı olan "M" tipi kullanılmıştır.



Şekil 1.2. P53 proteini üzerinde en sık mutasyon tanımlanan sıcak bölgeler amino asit numaralarıyla gösterilmiştir (Prives ve Manfredi, 1993).

1.1.2. Kaderinler

Kaderinler, moleküler ağırlıkları 120,000-140,000 arasında değişen, yapı ve fonksiyonları açısından Ca^{2+} 'a bağımlı transmembran proteinlerdir (Behrens, 1998). Yapısal anlamda kaderinler birbirilerine benzemektedirler. Birçok tekrarlayan ilimikten (domain) oluşan ve Ca^{2+} 'a bağlanmada önem taşıyan geniş bir hücre-dışı N-ucu ile, kaderinler arasında çok iyi korunan sitoplazmik bölümlle bağlantılı tek bir transmembran kısımdan oluşur. Sitoplazmik kısım üç sitoplazmik protein ile ilişkilidir; bunlar alfa, beta ve gamma katenindir (Kemler, 1992). Kaderinler üzerinde bulundukları dokulara göre isimlendirilirler ve bugün bilinen beş kaderin grubu vardır (Alattia ve ark., 2002). P53 e bağlı olarak çalıştığından normal dokularda tümör oluşumunu baskılamada görevlidir.

E-kaderinler: Epitel hücrelerinde eksprese olurlar.

P-kaderinler: Plasentada eksprese olurlar ancak belirli dönemlerde diğer dokularda da bulundukları bildirilmiştir.

V-kaderinler: Endotel hücreleri üzerinde eksprese olurlar.

N-kaderinler: Nöral dokularda ve kas hücrelerinde eksprese olurlar.

H-kaderinler: Kalp kasında eksprese olurlar (Lee, 1996).

Desmoglein, desmocollin gibi kaderin ailesi ile daha uzak ilişkili moleküller de vardır (Jung ve Ley, 1999). Kaderin/katenin haberleşmesinin kaderinlerin adeziv

fonksiyonunda önemli olduğu düşünülmektedir. Fibroblastlarda sitoplazmik kısmı bulunmayan E-kaderin ekspresyonunun fonksiyonel bir hücre-hücre adezyonu sağlayamadığı bildirilmiştir. Bunun muhtemel sebebi kateninlerle irtibat kurulamaması olabilir (Ozawa ve ark., 1990). Kaderinler, yanyana hücreler arasındaki moleküler bağlantıyı sağlarlar. Yapışma kavşaklarında fermuara benzer yapılar oluştururlar. Bu grupta bulunan desmosomlar hücre iskeletinin ara flamanları için kutuplaşma noktaları oluştururlar. Kaderinler, birbiri ile genelde homofilik karakterde ilişkiye girerler. Karşılıklı hücrelerde bulunan aynı kaderinler birbirine bağlanarak hücre-hücre adezyonunu sağlarlar. Kaderinlerin bu özelliği yukarıda bahsedilen histogenetik dağılımı sağlar. Kaderinler embriyoda morfogenezden, erişkin organizmada seçici hücre tanınmasından ve yaşam boyu normal doku mimarisinden sorumlu hücre yüzey glikoproteinleridir. Embriyoda özgün adezyon moleküllerinin ekspresyonu hücre göçü ve doku diferansiyasyonu için gereklidir. Kaderinlerin adeziv fonksiyonunu göstermek için normal koşullarda yüzeyinde bu molekülleri taşımayan hücrelere, kaderin cDNA transfeksiyonu yapılmı, bu hücreler kaderin moleküllerini eksprese etmeğe bağladıktan sonra adeziv özellik de kazanmıştır (Nagafuchi ve ark., 1987). Ayrıca, $Na^{+}-K^{+}$ ATPase gibi bazı moleküllerin de basolateral kısımda birikmeye bağlaması kaderinlerin epitele-benzer bir polarite de sağladığını, sinyal iletiminde de rol alabileceğini göstermiştir. Böylece, iki kaderinin ilişkisi bir dizi biyokimyasal olaya neden olarak doğru pozisyon, tanıma ve hücreler arası haberleşmeyi sağlamaktadır (Alattia ve ark., 2002). Tümör oluşumunda, kaderinlerin azaldığı belirlenmiştir. Tümör hücrelerinin düzensiz davranışı nedeniyle hücre-hücre ilişkisi tümörlerde bozulmuştur. Kaderinlerin hücre yüzeyinde azalması ile ortaya çıkan azalmış adezyon ve hücre ilişkilerinin neoplastik progresyonla ilişkisi her geçen gün daha da belirgin hale gelmeye başlamıştır (Lee, 1996). İnvaziv karsinoma hücrelerinin başlıca karakteristiği az diferansiye olmaları ve hareketliliklerinin artmış olmasıdır. E-kaderin hücrenin hareketlilik özelliğinin yok olmasına neden olur. E-kaderin ekspresyonu azalan epitel hücrelerinde diferansiyasyonunun azaldığı ve göç kabiliyetlerinin arttığı belirlenmiştir (Lee, 1996). Buradan E-kaderinlerin invaziv özelliğe karşı koruyucu olduğu sonucuna varılmıştır (Behrens ve ark., 1998). Ayrıca E-kaderinin birçok az diferansiye insan karsinom hücresinde bulunmadığı da tespit edilmiş ve bu hücrelerin invaziv özelliği E-kaderin cDNA transfeksiyonu ile ortadan

kaldırılmıştır (Frixen ve ark., 1991). Aynı şekilde meme kanserli hastalarda H-kaderin ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır (Lee, 1996).

E-cadherinler bilindiği üzere kanser bağlamında, geleneksel olarak bir tümör baskılayıcı olarak kategorize edilmiştir. İnterselüler bağlantıların oluşmasında önemli rol oynadığı ve epitelyal tümör progresyonunda epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) sürecindeki baskılayıcılığına dikkat çekilmiştir. Bozulmamış E-kaderin fonksiyonu, hücre hareketi için sabitleme noktaları sağlayarak ve hücre iskeletinin kasılmasına yardımcı olarak hücre göçü ve motilitesinde de önemli rollere sahiptir. E-cadherin genindeki (CDH1) genetik veya somatik mutasyonlar veya epigenetik mekanizmalarla indirgenmesi epitelyal kanserlerin oluşumunda gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, yeni kanıtlar E-cadherinin tümör progresyonunu çeşitli yönlerinde destekleyici rolüne işaret etmektedir. İnflamatuvar meme karsinomunun mikroembolisinde korunmuş (veya artmış) E-kaderin ekspresyonunun hücre-hücre temasları ile tümör hücresinin hayatta kalmasını, büyümesini ve invazyonunu destekleyebilir, yumurtalık karsinomasında olası bir “mezenkimalden epitelyal geçiş” (MET) tümör yayma sinyali kaskadları, daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyan mekanizmalar aracılığıyla dinamik E-cadherin kompleksleri tarafından indüklenebilir, bazı epitelyal kanserlerde kollektif hücre istilasısı gibi durumlar E-kaderin ekspresyonunun kötü huylu tümörlerde arttığını belgeler raporlardır (Rodriguez ve ark., 2012).

1.1.3. PERP

Birçok çalışma hücreler arası bağlantı düzensizliklerinin tümör oluşumu ve gelişimi ile ilişkili olduğunu ve desmozomal proteinlerin karsinogeneziste önemli rollerinin olduğunu gösterse de tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Bazı araştırmacılar P53 ve P63 genlerini regüle eden PERP (p53 apoptosis effector related to pMP-22) adı verilen bir genin tanımlamışlar, P53 apoptotik yolağında önemli rol oynadığından ve P63 aracılı hücre-hücre adhezyonuyla ilişkisi olduğundan bahsetmişlerdir. Başlangıçta sadece p53 hedef genlerinin p53 aracılı apoptozisi uyardığı düşünülmüş (p53 aracılı hücre döngüsünü blokajı haricinde), ancak sonraları desmozomlara yerleşen PERP proteinlerinin tespit edilmesiyle bu proteinlerin hücreler arası bağlantıların sağlanması ve tümör oluşumunu bastırmada P53 ile beraber kritik

bir rol oynadığı gösterilmiştir. Araştırmacılara göre PERP miktarında azalma, desmozom sayılarının azalması, desmozom komplekslerinin tutarsızlaşması hücre-hücre bağlantılarının bozulmasına neden olmakta ve oral kavitede kabarık görünümle sonuçlanmaktadır (Kong ve ark., 2013). PERP hücreler arası yapışma, desmozomların varlığı ve düzenlenmesi dışında homeostazisten de sorumludur. Bu nedenle eksikliği tümörigenezise neden olur. PERP yönünden zayıf farelerde yapılan deneysel çalışmalarda ultraviyole indüklü deri yassı hücre karsinomu, göğüs ve akciğer kanserlerinin şekillendiği tespit edilmiştir (Beaudry ve ark., 2010). Bunun dışında Marques ve ark. (2005) PERP geni yetersizliği oluşturulan hayvanlarda papilloma oluşumuna karşı bir direnç olduğu iddia edilse de daha sonra yapılan çalışmalar bu teorinin doğruluğunu çürütür niteliktedir (Franke ve ark., 2013).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmanın materyali 20 adet papillomlu ve 5 adet normal olmak üzere 25 adet sığır derisi örneklerinden oluştu. Papillomlu deri örneklerinden 10 adedi Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı blok arşivindeki, daha önceden teşhisi konulmuş parafin bloklardan, 10 adedi ise tez projesi sırasında anabilim dalına gönderilen papillom olgularından temin edildi. Beş adet deri örneği ise kontrol grubu olarak kullanılmak amacıyla anabilim Dalı'na başka hastalıklar nedeniyle getirilip derisinde lezyon bulunmayan sığırlardan nekropsisi sırasında temin edildi. Bu örneklerin 15'i dişi 10'u erkek hayvandan alındı. Dişilerin 3'ü düveydi. Çalışma grubundaki hayvanların 15 tanesi Holstein, 7 tanesi Simental, 3 tanesi Yerli Kara ırkı sığırlardan oluştu. Hayvanların yaşlarının 1-6 yaş arasında değiştiği saptandı. Kullanılan örneklerin vücuttaki lokalizasyonu değerlendirildiğinde lezyonların 4'ü abdominal bölge, 9'u baş-boyun bölgesi, 5'i meme ucu, 5'i preputium, 1'i interdigital bölge, 1'i art. cubitinin distalinde tespit edildi. 20 adet papillom olgusunun 3'ünün yapılan patolojik incelemeler sonucunda fibropapillom olduğu görüldü (Tablo 2.1.). Çalışmaya dahil edilen biyopsi örneklerinin dış görünüşleri ve kesit yüzleri incelenip makrofotografı çekildikten sonra boyutları ve makroskopik görünimleri kaydedildi. Tüm doku örnekleri %10'luk tamponlu formaldehitte tesbit edildi. Trimleme işleminden sonra doku takip cihazında (Leica ASP300S) yıkama, dereceli alkollerden (70, 80, 90, 96 ve 99'luk) geçirilerek dehidrasyonunu sağlama, ksilolde sertleştirilip 56 °C'deki sıcak parafinde bir gece bekletilme işlemleri otomatik olarak gerçekleştirildi. İşlenen dokular metal bezmountlar yardımıyla parafin bloklara gömüldü. Tüm bloklardan 4-5µ kalınlığında, her doku örneği için 1 adet normal ve 3 adet poly-l-lysin'li lamlara kesitler alındı.

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan materyallerin fenotipik özellikleri.

Olgu no	İrk	Cinsiyet/yaş	Yerleşimi	Patolojik tanı
1	Holstein	Dişi/5 yaş	Baş-boyun	PAPİLLOM
2	Holstein	Erkek/3 yaş	Baş-boyun	PAPİLLOM
3	Holstein	Düve/2 yaş	Abdominal bölge	PAPİLLOM
4	Simental	Dişi/3 yaş	Meme ucu	PAPİLLOM
5	Simental	Erkek/2 yaş	Abdominal bölge	PAPİLLOM
6	Holstein	Dişi/6 yaş	Meme ucu	FİBROPAPİLLOM
7	Holstein	Dişi/4 yaş	Art. Cubiti	PAPİLLOM
8	Simental	Erkek/1 yaş	Preputium	PAPİLLOM
9	Holstein	Erkek/1 yaş	Baş-boyun	FİBROPAPİLLOM
10	Holstein	Dişi/1 yaş	Abdominal bölge	PAPİLLOM
11	Holstein	Dişi/3 yaş	Meme ucu	PAPİLLOM
12	Simental	Dişi/2 yaş	Baş-boyun	PAPİLLOM
13	Holstein	Erkek/2 yaş	Preputium	PAPİLLOM
14	Yerli Kara	Düve/1,5 yaş	Meme ucu	PAPİLLOM
15	Holstein	Erkek/2 yaş	Baş-boyun	PAPİLLOM
16	Holstein	Dişi/5 yaş	Abdominal bölge	PAPİLLOM
17	Yerli Kara	Erkek/2 yaş	Preputium	FİBROPAPİLLOM
18	Simental	Dişi/3 yaş	İnterdigital bölge	PAPİLLOM
19	Holstein	Dişi/2 yaş	Baş-boyun	PAPİLLOM
20	Holstein	Erkek/1,5 yaş	Baş-boyun	PAPİLLOM
21(k)	Simental	Erkek/2 yaş	Preputium	KONTROL
22(k)	Simental	Düve/1 yaş	Baş-boyun	KONTROL
23(k)	Yerli Kara	Erkek/2 yaş	Preputium	KONTROL
24(k)	Holstein	Dişi/3 yaş	Meme ucu	KONTROL
25(k)	Holstein	Dişi/6 yaş	Baş-boyun	KONTROL

2.1. Histopatolojik Yöntemler

2.1.1. Histokimyasal yöntem

Normal lamlara alınan kesitler cam şaleler içerisindeki ksilolde 3 seri 5'er dakika deparafinize edildikten sonra yüksek dereceli alkollerden düşük dereceli alkollere doğru her şalede 5'er dakika bekletilmek suretiyle ilerletilerek rehidre edildi. Beş dakika distile suda bekletildikten sonra Mayer's hematoksilen'de 5-7 dakika kadar bekletildi. Devamında 5 dakika akarsuda yıkanarak fazla boya giderildikten sonra 2-3 dakika lithium carbonate içerisinde bekletilerek parlaklaşması sağlandı. Sonrasında 2-3 dakika alkolik eozinde bekletildikten sonra distile suda decolorize edildikten sonra

düşük dereceli alkollerden yüksek dereceli alkollere 5'er dakika çalkalanarak getirilerek her şalede 5'er dakika bekletilecek şekilde 3 seri ksilolde bekletilerek boyanan kesitler parlaklaştırıldı. Ksilolden çıkan kesitler entellan damlatılarak lamel yardımıyla kapatıldı. Pens yardımıyla hafifçe bastırılarak lam ile lamel arasındaki hava alınarak kurumaya bırakıldı. Kesitler daha sonra Olympus BX 51 ışık mikroskopunda incelenerek mikrofotografları çekildi.

2.1.2. İmmunohistokimyasal yöntem

Poly-L-lysinli lamlara alınan kesitler, önce dereceli alkollerden geçirilerek (99, 96, 80, 70) dokulara suyu geri verildi. Daha sonra distie su ve PBS'e (Phosphat buffer solution) daldırıldı. Endojen peroksit aktivitesini önlemek amacıyla % 0,2 hidrojen peroksitte 10 dakika bekletildi. PBS ile 2 kez yıkanan kesitlere nonspesifik antijenik boyanmaları önlemek için Protein blocking solüsyonu damlatılarak 30 dakika bekletildi. Tekrar 2 seri PBS ile yıkandıktan sonra primer antikorlar (P53, PERP ve E-cadherin) damlatılarak mikrodalga fırında 1 saat inkube edildi. Çıkarıldıktan sonra soğuması beklenip iki defa PBS ile yıkandıktan sonra biyotinize link damlatılarak 30 dakika bekletilip daha sonra tekrar iki seri PBS ile yıkandı. Daha sonra Streptavidin peroksidaz damlatılarak 30 dakika beklemeye alındı. İki defa PBS ile yıkandıktan sonra standart DAB cromojen solüsyonu damlatılıp mikroskop altında kontrol edilerek 5 dakikaya kadar antijenik yapıların boyanması sağlandı. Tekrar 2 defa PBS ile yıkayıp reaksiyon bitirildikten sonra ise Harris hematoksilen ile 5-10 dakika boyandı. Sonra akan çeşme suyunda 5 dakika yıkanarak fazla hematoksilen giderildi. Devamında doku kesitleri düşük dereceli alkollerden yüksek dereceli alkollere geçirilerek dehidrasyon sağlandı. Ksilolde parlaklaştırıldıktan sonra entellan yardımıyla üzerine lamel kapatılıp kurumaya bırakıldı ve Olympus BX 51 ışık mikroskopunda P53, PERP ve E- Cadherin ekspresyonları incelenerek mikrofotografları çekildi.

2.2. Semikantitatif Analiz

İncelenen kesitlerde H&E boyamalarda çok katlı yassı keratinize epitelde akantozis, hiper-parakeratozis, hidropik/balonumsu dejenerasyon, apoptozis,

spongiozis, yangı ve erozyon/ülser bulguları değerlendirildi. Skorlama kriteri olarak “-”; yok, “+”; hafif “++”; orta, “+++”; şiddetli olarak belirlendi.

İmmunohistokimyasal analizlerde ise epidermis ve dermişteki immün pozitif boyanmalar değerlendirildi. Çok katlı yassı keratinize epitelin Str. bazale, Str. spinozum, Str. granulozum, Str. lucidum ve Str. korneum katmanlarındaki boyanmalar X400 büyütmede boyanmanın yoğunluğuna göre skorlandı. Bu skorlamaya göre “-”; yok, “+”; hafif “++”; orta, “+++”; yoğun boyanma olarak belirlendi.

2.3. İstatistiksel Analiz

Çalışmada immunohistokimyasal skorların istatistik analizi SPSS 15.00 paket programda yapıldı. Gruplar arası farklar Student-T testi ile karşılaştırıldı. $P < 0.05$ olan değerler istatistik olarak önemli kabul edildi. Semikantitatif analiz tablolarındaki değerler $\text{mean} \pm \text{SD}$ olarak verildi.

3. BULGULAR

3.1. Makroskobik Bulgular

Saha çalışmasında karşılaşılan olgularda, Papillom oluşumlarının lokalizasyonları, boyutları, şekli ve kıvamları incelendi. Değerlendirme sonucunda lezyonların 4'ü abdominal bölgede, 9'u baş-boyun bölgesinde, 5'i meme ucunda, 5'i preputiumda, 1'i interdigital bölgede ve 1'i art. Cubitinin distalinde tespit edildi. Papillomların tamamının şekillerinin karnabahar görünümde düzensiz yüzeyle, kıvamının gevrek ve kolay parçalanabilir olduğu gözlemlendi.

Baş-boyun bölgesindeki papillomların baş bölgesinde bulunanları genel olarak göz, ağız ve burun çevresinde olduğu, boyutlarının 1x2 cmden 3x5 cm'ye değiştiği görüldü. Boyun bölgesindeki papillomlar, multifokal ya da dissemine dağılımlı olup boyutları 0,5x0,5 cm'den 8x10 cm'e kadar değişmekteydi (Şekil 3.1.).

Karşılaşılan meme başı papillomlu 5 olgunun 1'inde papillom 0,6 cm çapında ve pirinç tanesine benzer şekilde, diğer 4 olguda ise 0,5 cm den 8 cm'ye değişen çaplarda multilobuler olduğu not edildi.

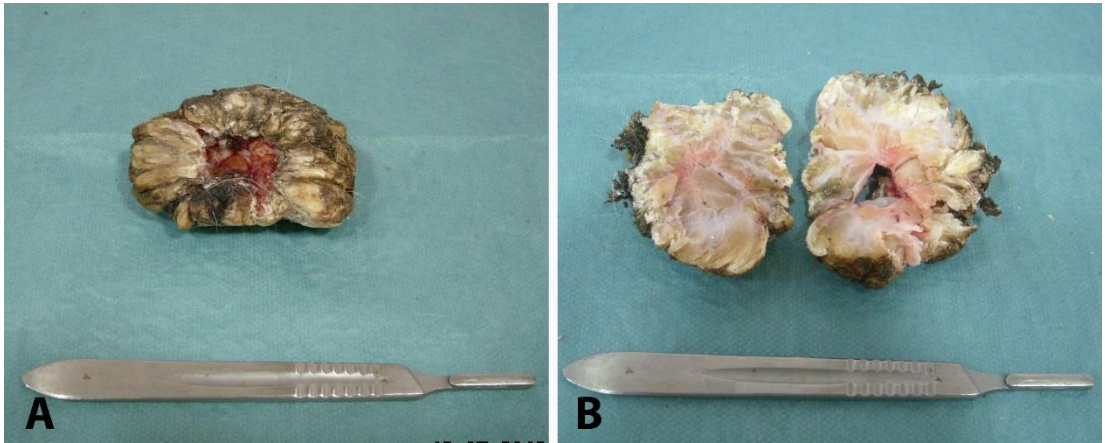
Preputiumdaki papillomların şekli ve boyutu meme başındaki lezyonlarla benzerlik göstermekteydi.

Bir olguda ayakta, parmak arası bölgede 4x3 cm boyutlarında papilloma rastlandı. Başka bir hayvanda ise sağ art. cubiti'nin distalinde, antebrachiumun kaudalinde lobuler görünümde 15x10 cm boyutlarında papillom tespit edildi (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Baş boyun bölgesinde (A) ve art. Cubiti’de (B) lokalize olmuş papillomlar.

Ekstirpe edilen papillomlara kesit atıldığında, kesit yüzünün kuru, yer yer nemli, renginin beyazdan krem rengi-sarıya değiştiği ve multilobuler görünümünde olduğu izlendi (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Ekstirpe edilen bir Papillomun dış görünüşü (A) ve kesit yüzünün görünümü (B)

3.2. Histopatolojik Bulgular

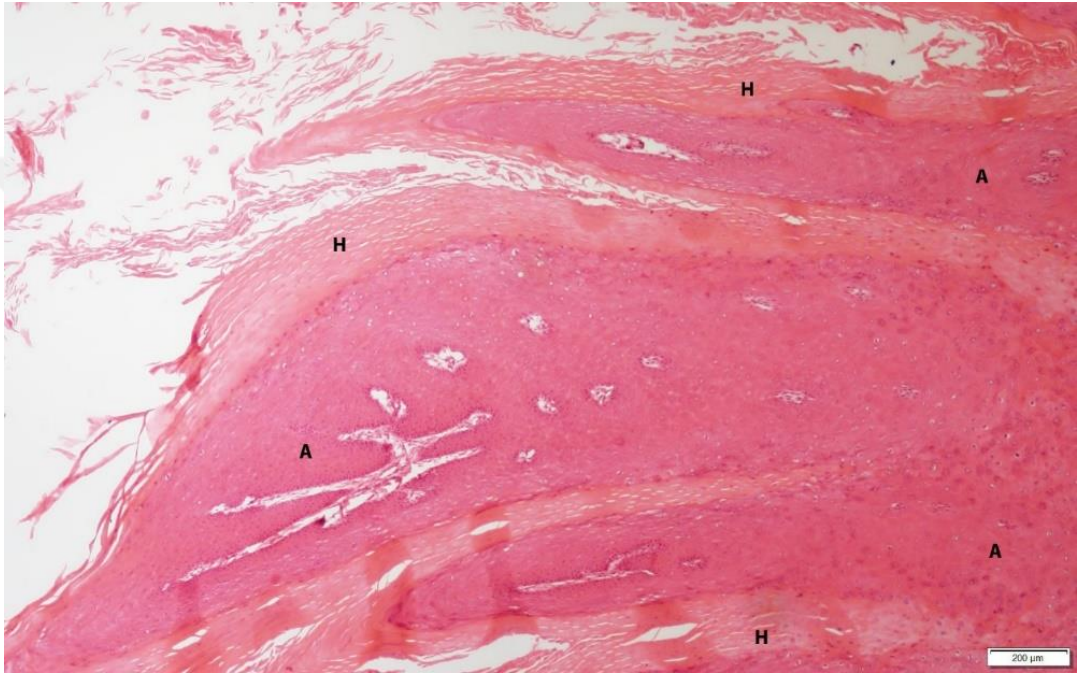
Histopatolojik olarak; doku kesitlerinin ışık mikroskopunda incelenmesi sonucunda, çok katlı yassı epiteldeki akantozis, spongiozis, apoptozis, yangı, erozyon-ülser, hiperkeratozis ve vakuoler/hidropik dejenerasyon yönünden değerlendirildi. Lezyonların şiddeti materyal metotta belirlenen skorlama kriterleri göz önünde bulundurularak belirlendi. Elde edilen veriler semikantitatif yöntemle skorlandı (Tablo3.1.)

Tablo 3.1. Histopatolojik değişikliklerin skor tablosu. “-“ yok; “+” hafif; “++” orta; “+++” şiddetli.

Olgu no	Akantozis	Apoptozis	Spongiozis	Yangı	Erozyon/ülser	Hiperkeratozis	Vakuoler/hidropik dejenerasyon
1	+++	+++	++	-	+	++	+++
2	+++	+++	+++	-	-	+++	++
3	+	+	+	-	-	+	++
4	++	+++	++	-	-	++	++
5	++	++	+	-	-	+	+
6	++	+++	++	-	-	++	++
7	++	++	+	-	-	+	+
8	+	+	+	-	-	+	+
9	+	++	++	-	-	++	++
10	++	+++	+++	-	-	+++	+++
11	+++	+++	++	-	-	++	++
12	++	++	+++	-	-	+++	+
13	+	++	++	-	-	++	++
14	+++	++	++	-	-	++	+++
15	++	++	++	-	-	++	+++
16	++	++	+++	-	-	+++	+++
17	+++	+++	+	-	-	+	+
18	+	+	+	-	-	+	+
19	++	++	++	-	-	++	+++
20	++	+	++	-	-	++	++
21(k)	-	-	-	-	-	-	-
22(k)	-	-	-	+	-	-	-
23(k)	-	+	-	-	-	-	-
24(k)	-	-	-	-	-	-	-
25(k)	-	-	-	-	-	-	-

Çok katlı yassı keratinize epitelin tüm mikroskop sahalarında dermise doğru genişleyerek parmakvari girintiler yaptığı belirlendi (Akantozis). Germinal katman oluşturan ve dermis ile sınır hattını oluşturan hiperkromatik bazofilik çekirdeklere

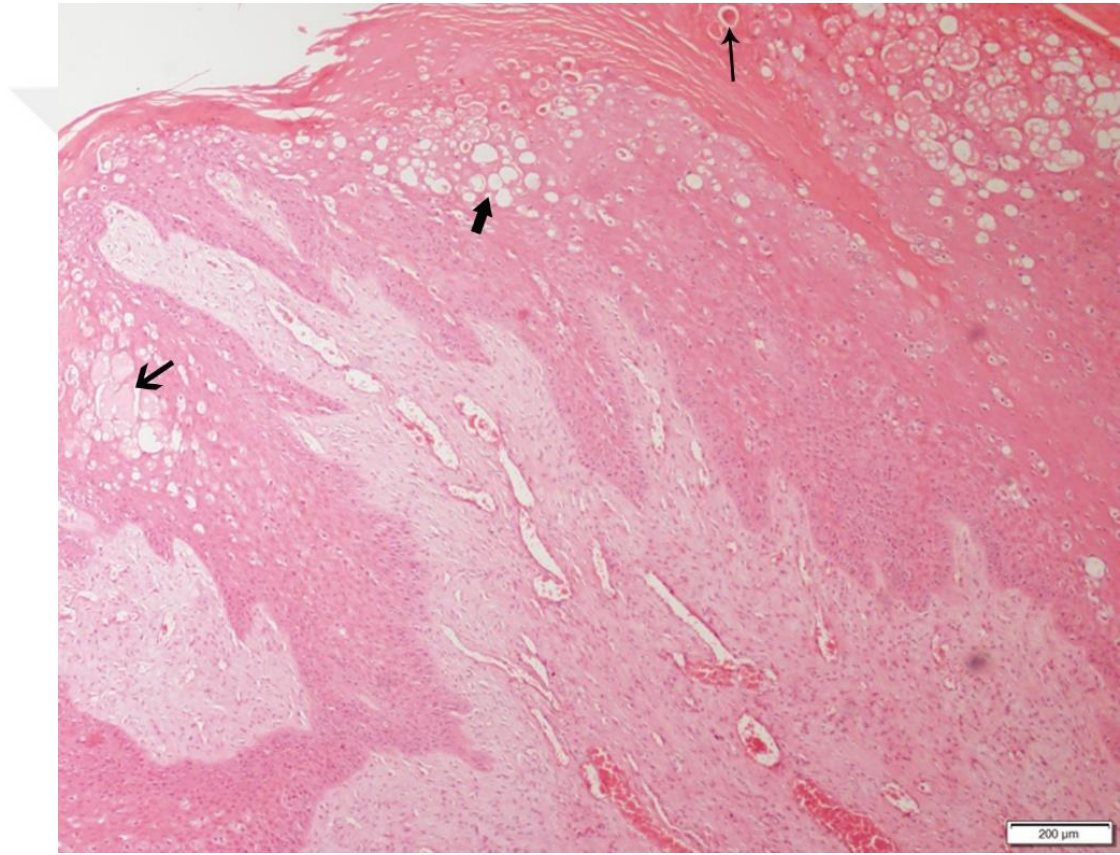
sahip Stratum basale katmanı genişlemişti. Mitotik figürler belirgindi. Bu katmanın normal histolojik yapıda gösterdiği parmak şeklindeki mikropapilla yapıları genişlemişti. Str. Lucidum katmanı ise oldukça ince olup epitel dokusunun yüzeye kadarki olan geniş kısmında bir kısmı parakeratotik bir kısmı ise ortokeratotik değişikliklere uğramış geniş bir Str. Corneum tabakası vardı. Bu tabaka üzeri geniş bir bant şeklinde yoğun bir keratin tabakasıyla kaplıydı (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Tümöral kitle, histopatolojik görünüm; çok katlı yassı epitelde akantotik (A) ve hiperkeratotik (H) değişiklikler. H&E, X40, barr: 200 µm.

Papillar uzantıların aralarındaki ceplerde ise yoğun vaskülarizasyon gözlemlendi. Bununla birlikte düzensiz bantlar halinde kollagen demetleri vardı. Str. Basale ile birlikte germinal katmanı oluşturan spinozum hücre katmanında da kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ileri derecede bir genişleme gözlemlendi. Spinozum hücreleri bazı alanlarda yüzeye yakın kısımlarda hidropik ve balonumsu dejenerasyona uğramış durumdaydı. Bu hücrelerin sitoplazmalarında sınırları keskin olmayan vakuoller gözlemlendi. İlerlemiş olaylarda ise çekirdeğin kenara itilerek iğ şeklini aldığı sitoplazmanın şişerek genişlediği dikkati çekti (balonumsu dejenerasyon). Dejenere hücre grupları zaman zaman birleşerek epitel tabakası içerisinde adacıklar halinde

makroveziküler ya da poröz görünümler oluşturduğu gözlemlendi. Bu boşluklardan bazılarının içerisinde açık renkli pembe homojen hyalini materyal bulunuyordu. Bazılarında ise boşlukların içerisinde fibrin iplikçiklerine benzer ağ yapısı mevcuttu (retiküler yapı). Str. lucidum'a yakın bölgelerde ise etrafında beyaz renkli bir halo bulunduran merkezde koyu pembe-mor renkli kuşgözü şeklinde parakeratotik alanlar dikkati çekti. Spinozum hücreleri üzerinde bulunan ve onlara göre daha yassı görünümde olan Str. Granulosum ve Str. Lucidum hücrelerinde de yer yer hidropik balonumsuya değişen degenerasyonlara rastlandı. (Şekil 3.4.).

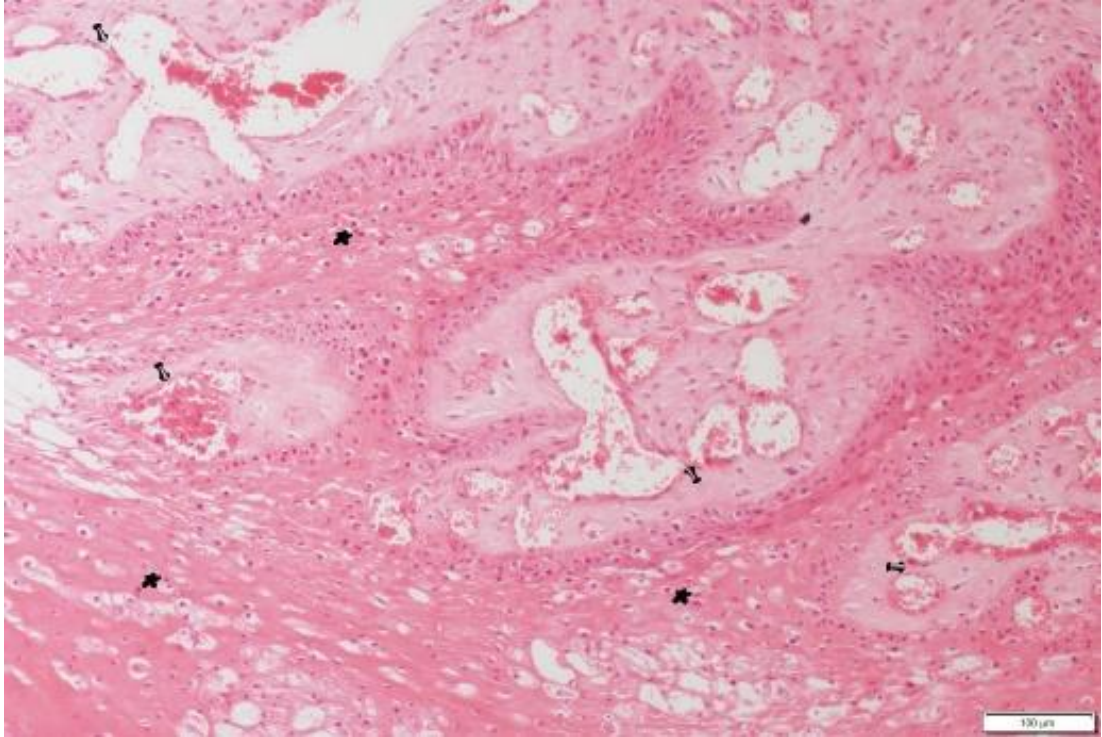


Şekil 3.4. Epidermiste akantotik değişiklikler, yüzeye yakın konumda hidropik-balonumsu degenerasyon ve spongiöz değişiklikler (Kalın ok), makro vezikül oluşumu ve içerisinde pembe homojen materyal birikimi (İnce büyük başlı ok), kuşgözü formasyonu (ince ok). H&E, X100, Barr: 200 µm.

Çok katlı yassı-keratinize epitelin üst yüzeyi demek olan bu kısım üzerinde bazı vakalarda keratin tabakasının sıyrıldığı ve bölgesel kanamaların varlığı gözlemlendi. Bazı kesitlerde ise sıyrılan bu tabakanın epitel katmanlarının derinlerine doğru ilerlediği, zaman zaman bulut tarzında koyu mavi-mor renkli bakteri

kümelerini barındırdığı belirlendi. Bu alanlar ise bazıları üzeri bir kabukla kapalı nötrofil lökosit ve makrofajların yoğunlukta olduğu yangı alanlarıyla karakterize idi. Yangının şiddetli olduğu olgularda epitel doku içerisinde nekrotik alanlara rastlandı.

Tümörün oluşumuna destek veren dermis katmanında ise en dikkat çekici bulgu, içleri eritrositlerle dolu durumda olan değişen çaplarda bir kısmı dilate durumda çok sayıda damar oluşumu idi. Bu damarlar bazı alanlarda yarıklanmalar şeklinde olup dermiste geniş bir alana yayılmış durumdaydı. Özellikle spongiöz değişikliklerin şiddetli olduğu bölgelerdeki dermiste kavernoöz görüntüde dilate venlere rastlandı. Bu venlerin lümenlerinde yoğun eritrositlerle beraber tek tük makrofaj ve lenfositler görüldü. Dermal-epidermal sınırda yoğun apoptotik hücrelere rastlandı. (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Epidermiste bazal membrana yakın bölgelerde spongiotik ve apoptotik hücre değişiklikleri (yıldız) ile dermişteki venlerde vazodilatasyon (raptiye). H&E, X50, 100µm Barr.

Tümörün stromasını oluşturan yapılarda yoğun ve düzensiz kollagen doku proliferasyonu da mevcuttu. Yüzeydeki erozyonların, sekonder enfeksiyonların ve nekrozların şiddetli olduğu vakalarda, dermiste zaman zaman damar lümenlerinde

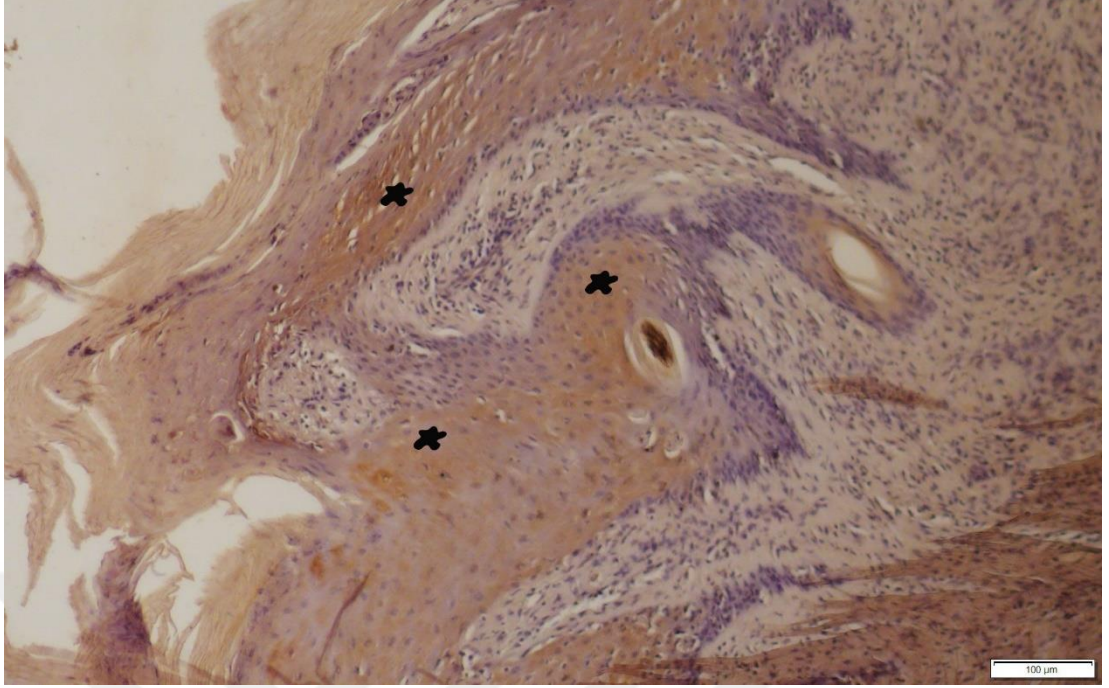
olmak üzere damar çevrelerinde etrafa yayılmış konumda nötrofil lökosit ve makrofaj infiltrasyonları gözlendi.

Dermiste dikkati çeken diğer bir lezyon ise yeni damar oluşumlarının çevrelerinden dermise doğru yayılan bazıları iri sitoplazmalı sucuk ya da sosis görünümünde bazıları ise ince ve yassı görünümde iğ şekilli çekirdeklere sahip yoğun kollagen demetleri içeren fibroblast ve fibrositlerdi. Bu hücrelerin tümör parankimini dermis tarafında çepeçevre kuşatma çabası içerisinde olduğu fark edildi. Tümör parankiminin dermisin içlerine doğru geniş kollar halinde yayıldığı gözlenirken bazı alanlarda ise adacıklar halinde hapsolmuş dermis kalıntıları görüldü.

3.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

3.3.1. Anti p53 Boyamalar

Tümöral dokunun parankimini oluşturan çok katlı yassı-keratinize epitelin hemen her bölümünde kahverenkli, değişen yoğunlukta anti-P53 (M type) immun-pozitif boyanmalar gözlendi. Str. basale, Str. spinosum ve Str. corneum yoğun, Str. granulosum ve Str. lucidum orta yoğunlukta immun-pozitiflik gösterdi. Boyanmaların hücresel bazda başta epitel hücre sitoplazmaları olmak üzere hücreler arası bağlantılarda da gözlendiği belirlendi. Kuvvetli immun-pozitiflikler yüzeye doğru azalma göstermekle beraber yüzeydeki keratin tabakasının yoğun olarak boyanması ise keratinin DAB boyasını kolay absorbe edebileceği düşüncesiyle dikkate alınmadı (Şekil 3.6.).

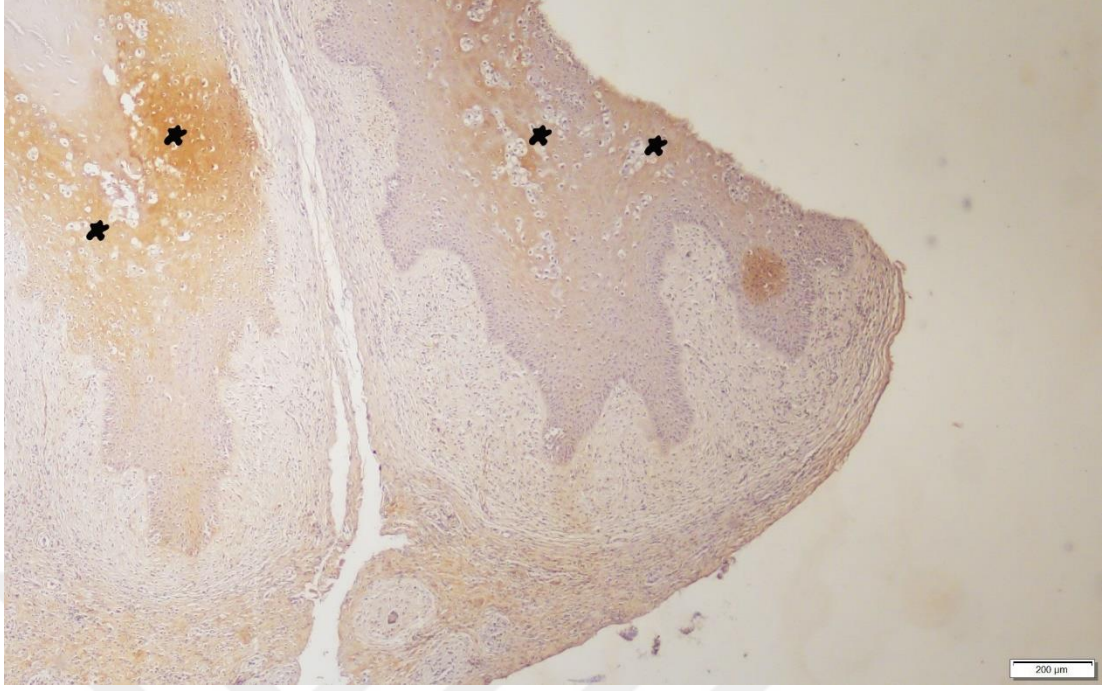


Şekil 3.6. Tümör parankiminde Anti-P53 kuvvetli immun-pozitif alanlar (yıldız). ABC-P, X100, Barr: 100µm.

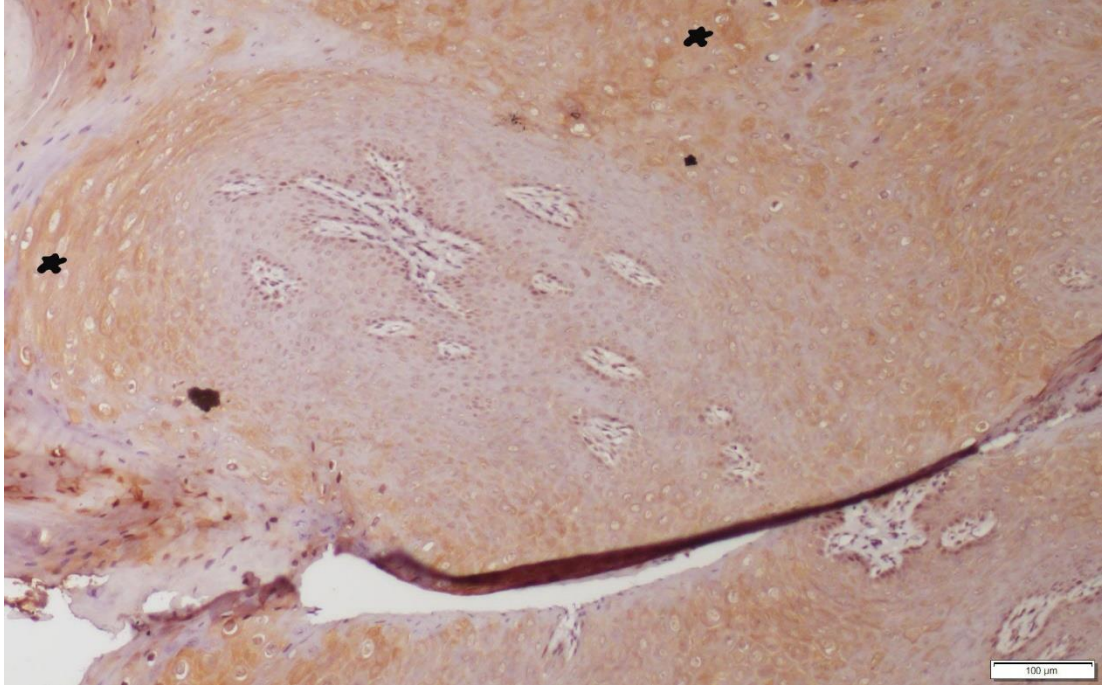
Bazı tümör kesitlerinde Str. Spinosum ve Str. Granulosum katmanlarındaki vakuoler ve hidropik dejenerasyonun yoğun olarak görüldüğü bölgelerde p53'ün diğer alanlara göre daha yoğun olarak boyandığı farkedildi (Şekil 3.7. ve Şekil 3.8.).

Bununla birlikte dermiste özellikle yeni damar oluşumlarının olduğu bölgede damar duvarları ve endotel hücrelerinde de yer yer kuvvetli immun-pozitiflikler belirlendi. İmmun-pozitif boyanmalar ayrıca fibroblast ya da fibrosit sitoplazmaları içerisinde kuvvetli, stroma içerisinde ise dağınık vaziyette ve hafif yoğunlukta idi (Şekil 3.9.).

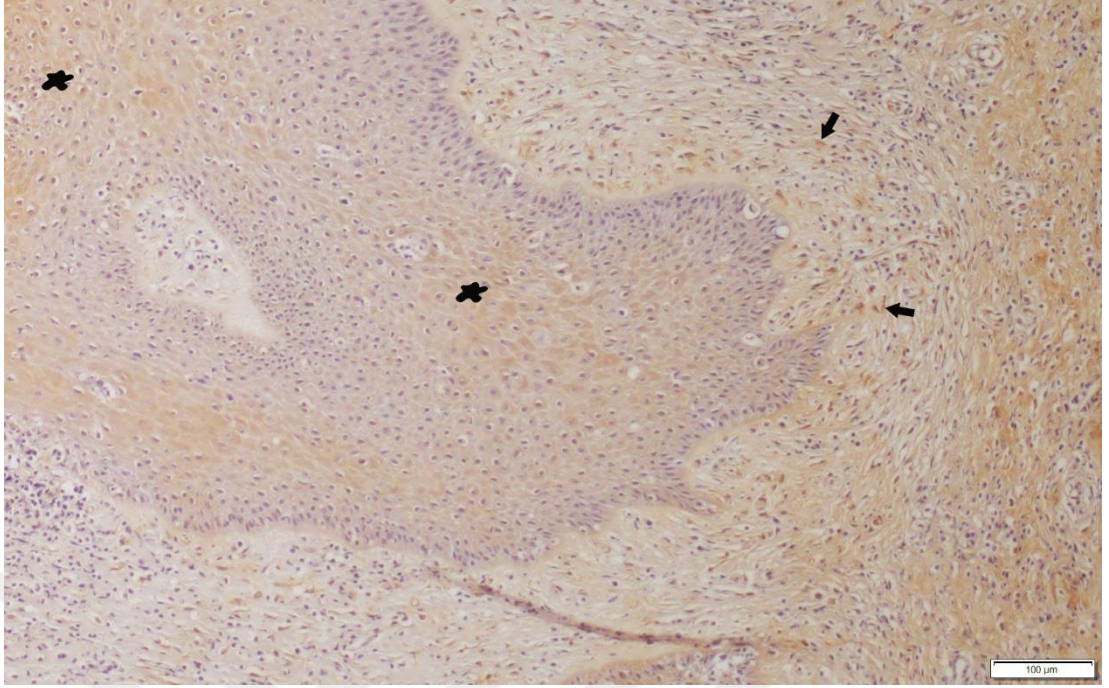
Kontrol grubu hayvanlarına ait deri kesitlerinde ise herhangi bir immun-pozitiflik gözlenmedi (Şekil 3.10.).



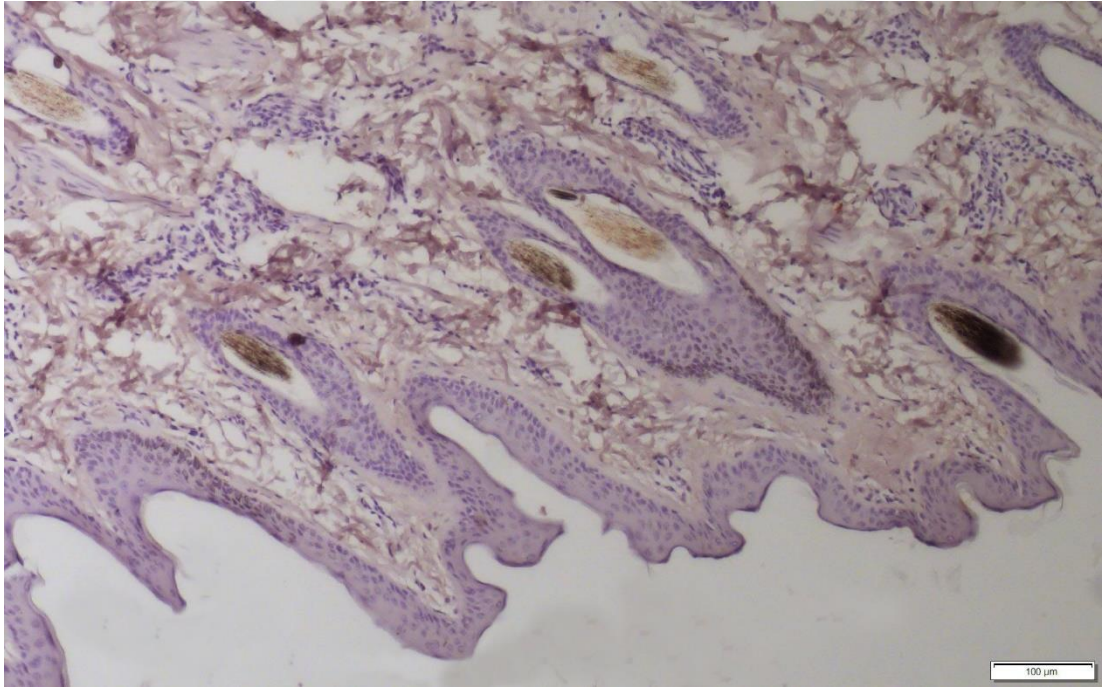
Şekil 3.7. Tümör parankiminde degeneratif bölgelerde Anti-P53 kuvvetli immunopozitif alanlar (yıldız). ABC-P, X40, Barr: 200µm.



Şekil 3.8. Tümör parankiminde degeneratif bölgelerde Anti-P53 kuvvetli immunopozitif alanlar (yıldız). ABC-P, X100, Barr: 100µm.



Şekil 3.9. Tümör stromasında Anti-P53 immun-pozitif boyanan alanlar (yıldız) fibroblast ve fibrositler (oklar). ABC-P, X100, Barr: 100µm.



Şekil 3.10. Normal deri, Anti-P53 negatif boyanmalar, ABC-P X40, Barr: 200µm.

Çok katlı yassı epitel dokuda Anti-P53 immunohistokimyasal boyamalardaki yoğunluğunun semikantitatif analiz değerleri Tablo 3.2.'de verilmiştir.

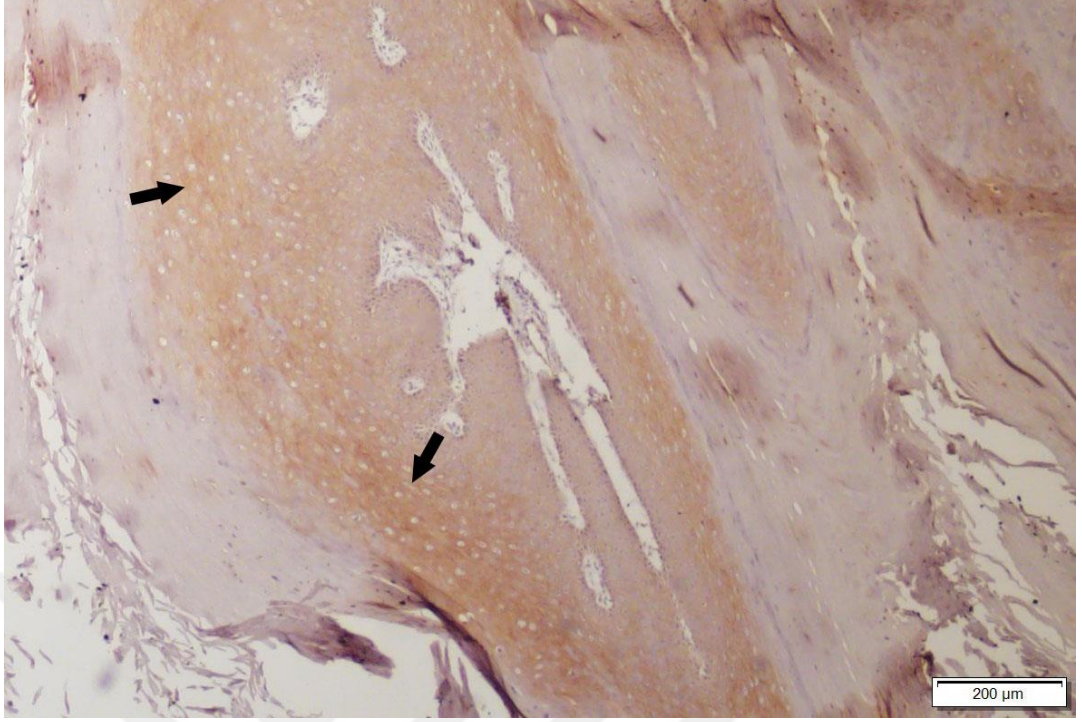
Tablo 3.2. Anti-P53 immunohistokimyasal boyamaların semikantitatif analizi

P53	EPİDERMİS					DERMİS	
Olgu no	Str. basale	Str. spinosum	Str. granulosum	Str. lucidum	Str. corneum	Damar duvarı/endoteli	Fibroblast Fibrosit
1	+++	+++	++	++	+	++	++
2	++	+++	++	+++	+	++	++
3	+++	+++	++	+	-	++	+
4	++	++	+++	+	+	+	++
5	++	++	+	++	+	++	+
6	+++	++	+	++	+	++	++
7	+++	+++	++	++	-	+	+
8	+++	+++	++	++	-	+	++
9	++	++	++	+	+	++	++
10	++	+++	++	++	+	+	++
11	+++	+++	++	++	+	++	++
12	+++	+++	+	++	+	++	++
13	+	++	+	+	+	++	+
14	++	++	++	++	-	+	+
15	++	+++	+	++	+	++	+
16	+++	+++	++	+	-	++	++
17	+++	++	++	+	+	+	++
18	++	+++	++	++	+	+	++
19	+++	+++	++	++	+	+	++
20	+++	++	++	++	-	++	++
21(k)	-	-	-	-	-	-	-
22(k)	-	-	-	-	-	-	-
23(k)	-	-	-	-	-	-	-
24(k)	-	-	-	-	-	-	-
25(k)	-	-	-	-	-	-	-

3.3.2. Anti E-cadherin Boyamalar

Anti-E-cadherin boyamalarda ise boyanmaların tümör parankimi içerisinde farklı yoğunluklarda olduğu dikkati çekti. İmmun-pozitif boyanmalar Str. basale ve Str. spinosum katmanlarında, özellikle spongiotik bölgelerde boyanmaların yoğun olduğu görüldü. Str. granulosum katmanında boyanmanın orta yoğunlukta immün-pozitiflik gösterdiği belirlendi. Str. lucidum ve Str. corneumda ise immün-pozitiflik çok hafif ya da hiç yoktu. Yüzeydeki keratin tabakasında da immün-pozitiflik gözlenmedi (Şekil 3.11. ve Şekil 3.12.).

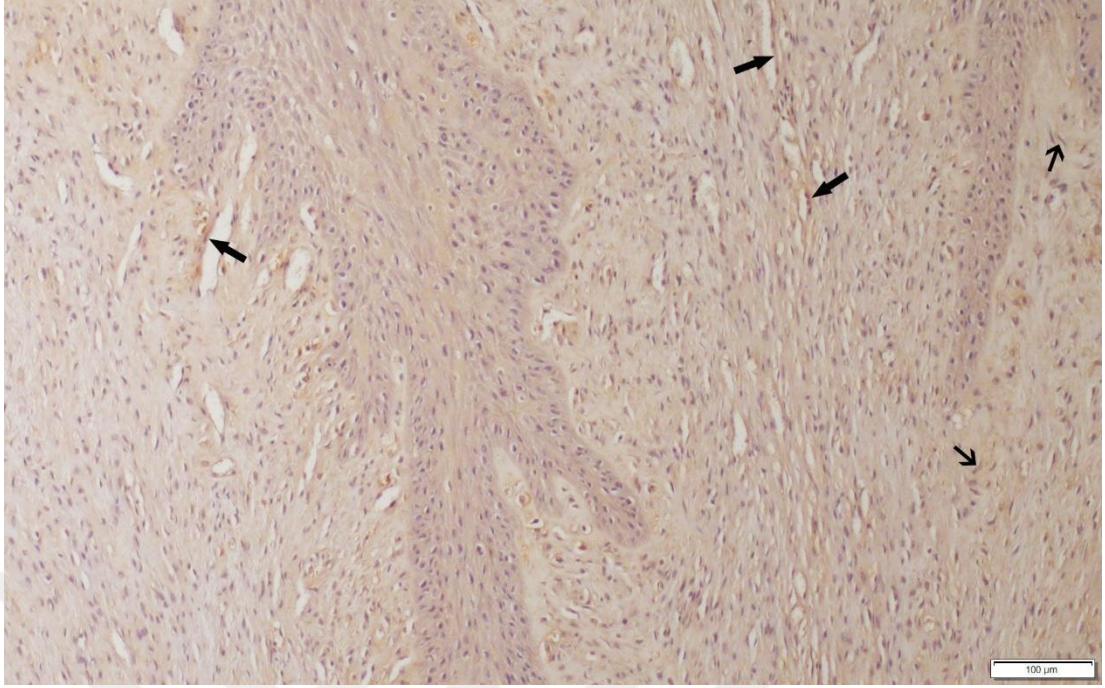
Dermisteki damar endotelleriyle birlikte tümör stromasındaki fibroblast ve fibrositlerde hafif immün-pozitiflik tespit edildi (Şekil 3.13.).



Şekil 3.11. Tümör parankiminde degeneratif bölgelerde Anti-E-cadherin kuvvetli immun-pozitif alanlar (oklar). ABC-P, X40, Barr: 200µm.

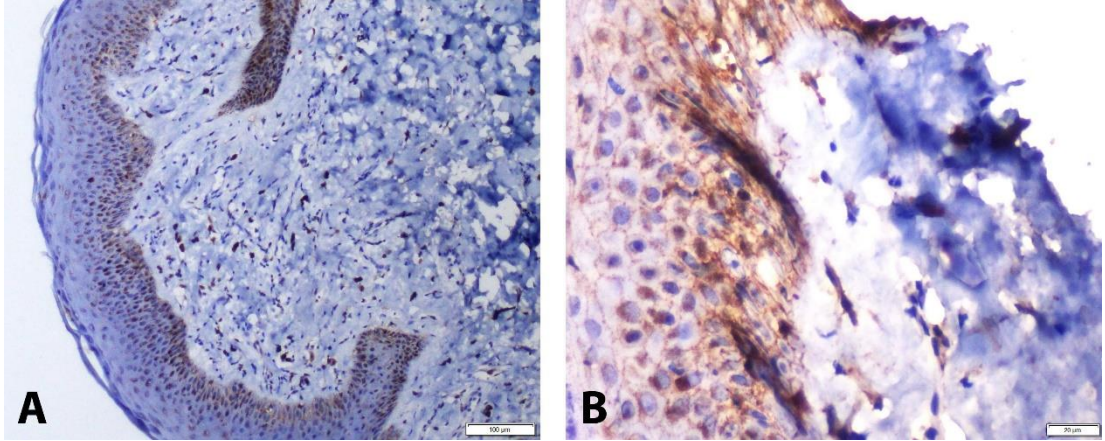


Şekil 3.12. Tümör parankiminde degeneratif bölgelerde Anti-E-cadherin kuvvetli immun-pozitif alanlar (yıldızlar). ABC-P, X40, Barr: 200µm.



Şekil 3.13. Tümör stromasının Anti-E-cadherin immun-pozitif boyanan alanlar damar duvarlarında (kalın oklar), fibroblast ve fibrositler (ince oklar). ABC-P, X100, Barr: 100µm.

Kontrol grubu hayvanlarına ait deri kesitlerinde ise hücrelerarası adezyon bölgelerinde ve Str. basale'de çok hafif immun-pozitiflik gözlemlendi (Şekil 3.14.).



Şekil 3.14. Normal deri, epitel hücreleri arasında ve sitoplazmalarında Anti-E-cadherin hafif immun-pozitif boyanmalar, ABC-P A:X40, Barr: 100µm, B: Yakın görünüm, X400, Barr: 20µm.

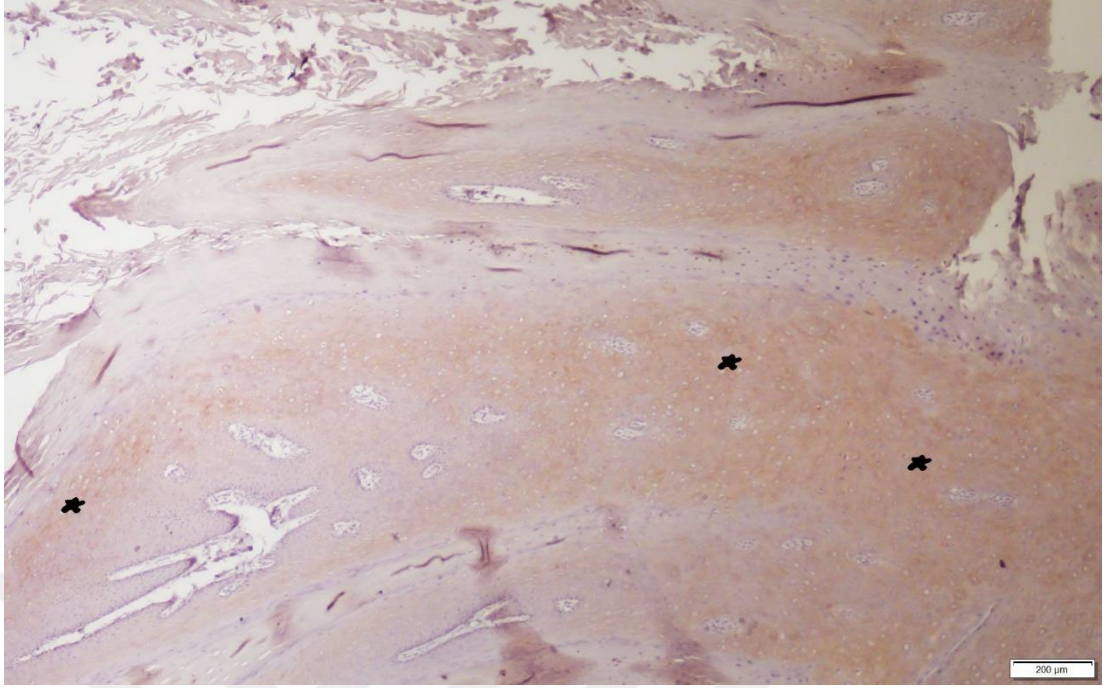
Çok katlı yassı epitel dokuda Anti-E-cadherin immunohistokimyasal boyamalarındaki yoğunluğunun semikantitatif analiz değerleri Tablo 3.3.'te verilmiştir.

Tablo 3.3. Anti-E-cadherin immunohistokimyasal boyamaların semikantitatif analizi

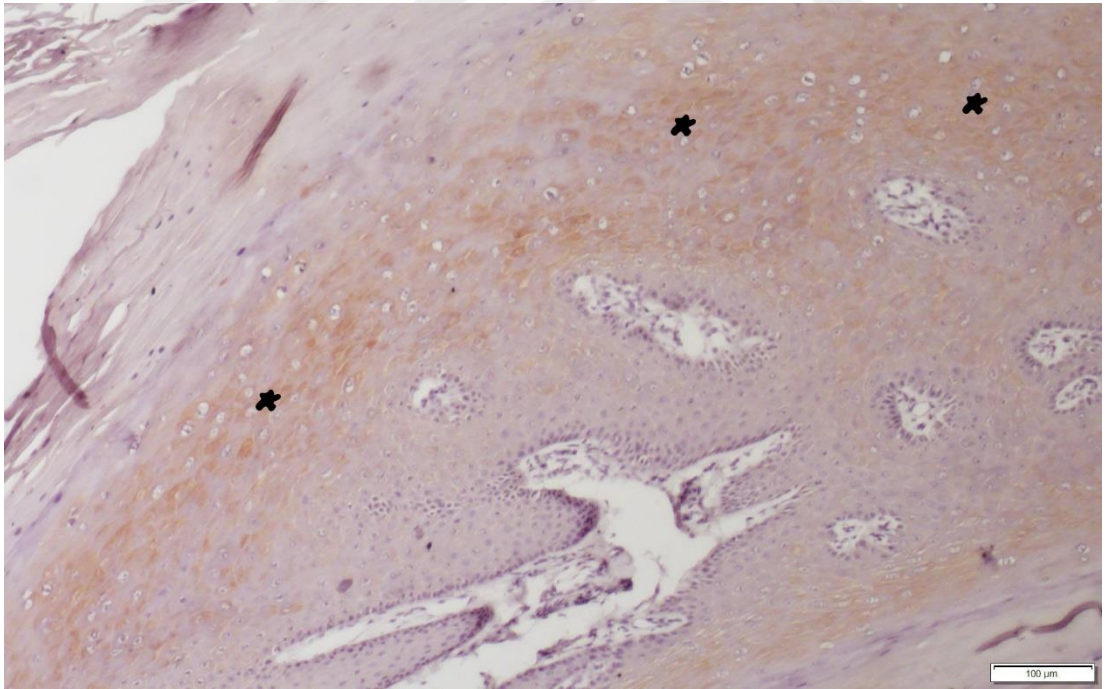
E-cadherin	EPİDERMİS					DERMİS	
Olgu no	Str. basale	Str. spinosum	Str. granulosum	Str. lucidum	Str. corneum	Damar duvarı/endoteli	Fibroblast Fibrosit
1	+++	+++	+	+	-	+	-
2	+++	++	+	+	-	+	-
3	+++	+++	++	+	-	+	-
4	++	+++	+	+	+	+	-
5	++	+++	+	+	-	+	-
6	+++	++	+	+	-	+	-
7	+++	++	+	+	-	+	+
8	+++	+++	+	+	-	+	-
9	++	+++	+	+	-	+	-
10	+++	+++	+	+	-	+	-
11	++	++	+	+	-	-	-
12	+++	++	+	+	-	+	+
13	++	+++	+	+	-	+	-
14	+++	+++	+	+	-	+	-
15	++	+++	++	-	-	+	-
16	+++	++	++	+	-	+	-
17	+++	++	+	+	-	-	-
18	+++	+++	+	+	+	+	-
19	++	++	+	+	-	+	-
20	+++	+++	+	+	-	+	-
21(k)	+	-	+	+	+	+	+
22(k)	+	+	+	+	+	+	+
23(k)	+	+	-	-	+	+	+
24(k)	+	-	+	+	+	+	+
25(k)	+	+	+	-	+	+	+

3.3.3. Anti PERP Boyamalar

Anti-PERP immun-pozitif boyamalar anti-E-cadherin immun-pozitif boyanma alanlarıyla paralellik göstermekteydi. Ancak anti-E-cadherin immun-pozitif boyanmalara göre daha hafif yoğunlukta idi. Özellikle Str. spinosum ile Str. granulosum katmanlarındaki dejenere hücrelerin olduğu bölgelerde boyanmaların daha kuvvetli olduğu, epitel hücre sitoplazmaları ve hücreler arası bağlantıların orta ve zayıf immun-pozitif boyandığı tespit edildi (Şekil 3.15. ve Şekil 3.16.).



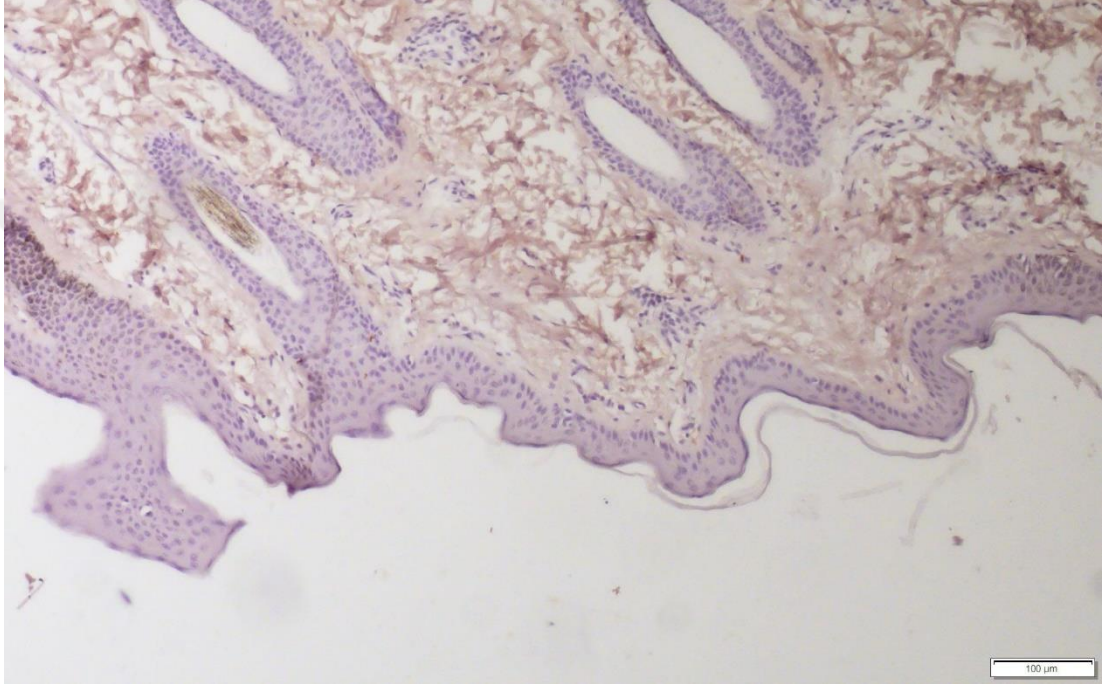
Şekil 3.15. Tümör parankiminde dejeneratif bölgelerde Anti-PERP kuvvetli immun-pozitif alanlar (yıldızlar). ABC-P, X40, Barr: 200µm.



Şekil 3.16. Tümör parankiminde dejeneratif bölgelerde Anti-PERP hafif immun-pozitif alanlar, yakın görünüm (yıldızlar). ABC-P, X100, Barr: 100µm.

Dermisteki damar endotellerinde hafif immun-pozitiflik gözlenmekle beraber tümör stroması içerisindeki fibroblast, fibrosit ve kollagen dokuda pozitif boyanma gözlenmedi.

Kontrol grubu derilerinin histolojik kesitlerinde epitel katmanlarının hiçbir yerinde immun-pozitif boyanma gözlenmedi (Şekil 3.16.).



Şekil 3.17. Normal deri, Anti-PERP negatif boyanmalar, ABC-P X40, Barr: 200µm.

Çok katlı yassı epitel dokuda Anti-PERP immunohistokimyasal boyamalarda ki yoğunluğunun semikantitatif analiz değerleri Tablo 3.4.'de verilmiştir.

Tablo 3.4. Anti-PERP immunohistokimyasal boyamaların semikantitatif analizi

Anti- PERP	EPİDERMİS					DERMİS	
Olgu no	Str. basale	Str. spinosum	Str. granulosum	Str. lucidum	Str. corneum	Damar duvarı/endoteli	Fibroblast Fibrosit
1	++	++	+	-	-	+	-
2	++	++	+	-	-	+	-
3	++	++	-	-	-	+	-
4	+	++	+	-	-	+	-
5	+	++	+	-	-	+	-
6	++	+	+	-	-	+	-
7	++	++	+	-	-	-	-
8	++	++	+	-	-	+	-
9	++	++	-	-	-	+	-
10	+	+	+	-	-	+	-
11	++	++	+	-	-	+	-
12	+	+	+	+	-	+	-
13	++	++	+	-	-	+	-
14	+	+	+	-	-	-	-
15	+	++	-	-	+	+	-
16	++	++	+	+	-	+	-
17	++	++	+	-	-	+	-
18	++	++	+	-	-	+	-
19	+	+	-	-	-	+	-
20	++	++	+	-	-	+	-
21(k)	-	-	-	-	-	-	-
22(k)	-	-	-	-	-	-	-
23(k)	-	-	-	-	-	-	-
24(k)	-	-	-	-	-	-	-
25(k)	-	-	-	-	-	-	-

3.4. İstatistiksel Analiz

Histopatolojik doku kesitlerinde karşılaşılan Papilloma olgularında gözlenen lezyonların semikantitatif analiz sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapıldı. Tüm olgularda Akantozis, Apoptozis, Spongiozis, Yangı, Erozyon, Hiperkeratozis ve Dejenerasyon lezyonlarının kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur(Tablo 3.5.).

Tablo 3.5. Histopatolojik skorların istatistik analiz sonuçları

Histopatolojik Lezyonlar	Papilloma	Kontrol	P değeri
Akantozis	2.00±0.72	0.00±0.00	<0.05
Apoptozis	2.15±0.74	0.00±0.00	<0.01
Spongiozis	1.90±0.71	0.00±0.00	<0.05
Yangı	0.20±0.02	0.00±0.00	<0.01
Erozyon	0.35±0.10	0.00±0.00	<0.001
Hiperkeratozis	1.90±0.71	0.00±0.00	<0.05
Dejenerasyon	2.00±0.79	0.00±0.00	<0.05

İmmunohistokimyasal boyamaların sonucunda dokularda görülen immun-pozitif bölgelerin yoğunluğu istatistiksel olarak analiz edildi. Tümör parankim ve stroma bölgelerinin P53, E-cadherin ve PERP için boyanmalarının kontrol grubuyla karşılaştırılarak elde edilen analiz sonuçları Tablo 3.6.'de verilmiştir. Bu analiz sonuçlarına göre çok katlı yassı epitelin str. basale, str. spinosum, str. granulosum bölgelerindeki immun-pozitif boyanmaların yoğun olması istatistiki yönden anlamlı bulundu. Buna ek olarak daha önce belirtildiği üzere str lucidum ve str corneum tabakalarındaki boyanmaların yoğunluğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Tablo 3.6. İmmunohistokimyasal skorların istatistik analiz sonuçları

Protein	Grup	Str. basale	Str. spinosum	Str. granulosum	Str. lucidum	Str. corneum	Damar duvarı/endoteli	Fibroblast Fibrosit
P53	Papil	0.35±0.10	2.20±0.76	0.35±0.10	1.45±0.82	0.45±0.15	1.35±0.67	1.70±0.47
	Kont	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.20±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00
	P değeri	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.05	<0.001	<0.001
Ecad	Papil	0.75±0.16	0.80±0.17	1.20±0.69	0.35±0.10	0.35±0.10	0.30±0.10	0.10±0.02
	Kont	0.00±0.00	0.40±0.24	0.60±0.24	0.40±0.24	0.80±0.20	1.00±0.00	1.00±0.00
	P değeri	<0.001	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.001	>0.05
Perp	Papil	0.75±0.16	0.90±0.17	0.70±0.47	0.10±0.02	0.10±0.02	0.85±0.36	0.00±0.00
	Kont	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	P değeri	<0.001	<0.01	<0.001	>0.05	>0.05	<0.05	>0.05

4. TARTIŞMA

Sığırlarda deri papillomlarının genellikle baş-boyun, ekstremiteler, genital organlar çevresinde sıklıkla görüldüğü bilinmektedir ancak neden bu bölgelerde sıklıkla görüldüğü konusunda net bilgilere ulaşılamamıştır (Hargis, 1995, Hazıroğlu ve ark., 2000, Meuten, 1998). Çalışmada kullanılan hayvanlarda kitlelerin yerleşim yerleri literatür verileriyle uyumluydu. Sığır deri papillomlarının onkojenik bir virüs olan bovine papillomavirus (BPV) tarafından oluşturulduğu düşünüldüğünde bu bölgelerin hayvandan hayvana ya da bulaşık materyalle temas durumunda olduğu bölgelerde görülmesini açıklamaktadır. Kitlelerin görüldüğü yerin deri kalınlıklarının farklı olması papillom oluşan derinin kalınlığıyla alakalı olmadığını ancak derideki muhtemel sıyrık ya da portantrelerden kaynaklı olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte papillomavirusların sağlam deriden geçtiğine dair literatür bilgisine ulaşılamamıştır.

Deride gözüken papillomalar solid ya da multiple olarak (papillomatozis) şekillenmektedir. Solid kitleler multiple olanlara göre daha büyük boyutlara ulaşabilmektedir. Yapılan çalışmada solid kitlelerden alınan doku kesitlerinde dejeneratif ve nekrotik değişikliklerin multiple olanlar göre daha şiddetli olduğu belirlenmiştir. Bu dejeneratif-nekrotik alanlarda anti-E-cadherin ve anti-perp immun-pozitif boyanmaların yoğun olması bu moleküllerin papillomun progresyonunu baskılamada önemli rol oynadığı görüşünü desteklemektedir. Diğer yandan multiple kitlelerin oluşumunun belirli bir büyüklüğe ulaştığında vücudun savunma mekanizmaları yoluyla baskılandığından Papillomavirus'un derinin başka bir yerinde yeniden tümör oluşturduğu düşüncesini akla getirmektedir.

P53 geni, vücudun otokontrol mekanizmalarından birisidir. Hasarlı genlerin tamiri ya da yok edilmesinin yanında, hücre üremesini apoptozis yolağını kullanarak kontrol eder. Ayrıca amaçsız, sınırsız ve kontrolsüz büyüyen hücreleri baskılayan anti-tümörojenik etkilerinin olduğu bilinmektedir (Attardi ve ark., 2000). P53 geninin inaktivasyonu, hasarı ya da geçirdiği mutasyon tümör oluşumuna yol açar (Kishore ve ark., 1996; Levine ve ark., 2004; Marques ve ark., 2005). Yapılan araştırmalarda iki tip P53 proteininden bahsedilmektedir; wild type (W) ve mutant type (M). Bu nedenle

dokunun hücre üremesi, dolayısıyla tümör oluşumuna gösterdiği direncin belirleneceği durumlarda “W” tipi, tümör oluşumunun belgeleneceği durumlarda ise “M” tipi P53 proteininin salınımlarına bakılmaktadır (Levine ve ark., 2004). Bu çalışmada sığır deri papillomlarında tümörün oluşumunu belgeleyen P53 markerı olan “M” tipi kullanılmıştır. Uygulanan immunohistokimyasal tekniklerde anti-P53 markerlarının papillomlu dokularda pozitif sonuç verip normal deride negatif sonuçlar vermesi literatür verileriyle uyum göstermekteydi. Bu düşünceden yola çıkılarak normal dokulardaki P53 proteinlerinin papillomaviruslarca mutasyona uğratıldığı ve tümörügenezisin bu nedenle başladığı düşüncesine varıldı.

Marques ve arkadaşları (2005), transjenik farelerde yapmış oldukları bir çalışmada deneysel olarak papillom oluşturmuş ve PERP yetersizliği olan farelerde papillomlara karşı bir direnç şekillendiğini ancak bunların 10 gün içerisinde öldüğünü, bunula birlikte papillom oluşan hayvanlarda ise PERP düzeylerinin yüksek olduğunu göstermişlerdir. Marques ve arkadaşları (2005)’na göre PERP sadece P53’bağlı değil aynı zamanda P63 aktivasyonuna da bağlı olduğunu ileri sürmektedir. P63’ün, P53(W tipi)’ün bozulduğu ya da eksik olduğu durumlarda PERP’i uyararak apoptozisi başlattığını ileri sürmektedirler. İncelenen tümör kesitlerinde hidropik dejenerasyon ve spongiosisın görüldüğü bölgelerde yoğun Anti-PERP immun-pozitif boyanmaların gözlenmesi PERP’in apoptozisle doğrudan ilişkili olduğunu gösterdi. Çalışmamızda yalnızca P53, PERP ve E cadherin markerları incelendiğinden P63 ile ilgili sistemlerin devreye girip girmediği belirlenememiştir. Bu nedenle bahsi geçen durumun açıklığa kavuşturulabilmesi için P63 ve P73 gibi proteinlerinin ayrıca değerlendirilmesi gerekmektedir.

Papillomlarda immun sistemin aktivasyonu ile birlikte zaman zaman tümör regresyonunun şekillendiği bilinmektedir (Özsoy ve ark., 2011). Çalışmada bazı kesitlerde Str. spinosum katmanında yoğun spongiotik alanların gözlendiği belirlenmiştir. Aynı zamanda tümörün stromasında damarlardaki kavernöz görünüm ve şiddetli hiperemi gözlenmiştir. Aynı kesitlerin Anti-PERP boyamalarda da ilgili alanların yoğun bir şekilde boyandığı tespit edilmiştir. Bu nedenle PERP’in papillomların baskılanma durumunda arttığı ve tümör benignitesinde belirteç olabileceği düşünülebilir.

Marques ve arkadaşları (2005) epitelial bariyerin bütünlüğünü sağlayan E-cadherin ve cathedin gibi adhezyon molekülleriyle birlikte PERP'in tümör hücrelerinin mobilizasyonunu engellediğini ifade etmektedirler. Elde ettiğimiz sonuçlar değerlendirildiğinde papilloma gözlenen dokularda genel olarak P53 markerlarının yoğun, E-cadherin ve PERP markerlarının ise orta düzeyde boyandığı belirlendi. Hidropik dejenerasyon ve spongiosis bulunduğu bölgelerde ise PERP miktarının artmasının nedeninin papillomatozisi regrese etme çabası olduğu ve P53 (W tip)'ün devre dışı kalmasıyla alternatif bir savunma olarak PERP'in aktif hale gelerek apoptozisi başlattığı şeklinde yorumlandı. e-cadherin molekülleri ile birlikte hücreler arası yapışma ve bağlanmaya yardımcı olan PERP moleküllerinin tümörün de bütünlüğünü sağladığı yönünde raporlar mevcuttur. Bu yapışkan moleküllerin tümörünezezinin geç safhasında molekülleri yapıştırma yoluyla metastazları engellediği yönünde görüşler mevcuttur.

Normal deri dokusunda Perp proteinleri hücre sitoplazmaları ve hücrelerarası bağlantılarda bulunmaktadır. Marques ve arkadaşları (2005) deneysel olarak perp proteini baskılanmış farelerde yaptığı çalışmada, bu hayvanlarda papillom oluşmadığını ancak Ultraviole aracılı squamoz cell carcinom'un şekillendiğini bildirmiştir. Yapılan bu çalışmada papillom kesitlerinde anti-perp immun-pozitif alanlara rastlanmıştır. Görülen bu pozitif alanların dejenere hücrelerin olduğu bölgede daha yoğun olarak boyandığı fark edilmiştir. Bu durum dokulardaki perp miktarının tümör oluşumunda etkili olmadığı ancak tümörün invazyon ve metastaz özelliklerini apoptozis yoluyla baskıladığı şeklinde yorumlanmıştır.

Rodriguez ve arkadaşları e-cadherinlerin epitelyal tümörler için baskılayıcı olduğunu ancak agresif beyin tümörü, yagısal meme tümörü ve birleşik epitelyal mezenkimal tümörler gibi bazı malign özellikteki tümörlerde e-cadherinlerin baskılayıcı özellik göstermediği sonucuna varmışlardır. Yapılan bu çalışmada papillomalı çok katlı yassı epitel doku örneklerinde özellikle dejenere bölgelerde daha fazla olmak üzere, tümör parankimi ve stromasında yoğun immun-pozitif boyanmalar olduğu tespit edildi. Bu durum Rodriguez'in çalışmasına ek olarak deri papillomlarda e-cadherin salınımının, tümörün büyümesi, metastazı ve invazyonunu baskıladığını düşündürmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sığırlarda deri papillomları sıklıkla görülen ve bulaşıcı bir onkojenik virus olan Bovine Papillomavirus (BPV) kökenli iyi huylu neoplastik bir hastalıktır. Tanısı ve tedavisi konusunda birçok çalışma yapılmasına rağmen patogenezi ve kötü huylu neoplazilere dönüşümüyle ilgili yapılan çalışmalar sınırlıdır. Bu çalışmada sığırlarda deri papillomunda mutant (M) tip P53 proteininin varlığı ile E-cadherin ve PERP proteinlerinin tümör progresyonundaki rolü araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarda Anti-P53 yoğun pozitif boyanan dejenere bölgelerin aynı zamanda anti-E-cadherin ve anti-PERP pozitif boyandığı tespit edilmiş, papillomların sınırlı ve in-situ özelliklerinin E-cadherin ve PERP proteinlerinin birbirilerini destekleyici özellikleri sayesinde sağlandığı sonucuna varılmıştır. Bu çalışma ile elde edilen bilgiler ışığında papillomların prognoz ve patogenetik mekanizmaları biraz daha aydınlatılmıştır. Ancak konu hakkında değişik yöntem ve markerlarla farklı çalışmalar yapılarak yeni bilgilere ulaşılabilir.

KAYNAKLAR

Alattia JR, Tong KI, Takeichi M, Ikura M (2002). Cadherins. In Calcium-Binding Protein Protocols. *Humana Press.*, 199-210

Attardi LD, Reczek EE, Cosmas C, Demicco EG, McCurrach ME, Lowe SW, Jacks T (2000). PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. *Genes & develop.*, **14(6)**, 704-718.

Beaudry VG, Jiang D, Dusek RL, Park EJ, Knezevich S, Ridd K, Attardi LD (2010). Loss of the p53/p63 regulated desmosomal protein Perp promotes tumorigenesis. *PLoS genetics*, **6(10)**, e1001168.

Behrens J, Mareel MM, Van Roy FM, Birchmeier W (1989). Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J of Cell Biol.*, **108(6)**, 2435-2447.

Behrens J (1994). Cadherins as determinants of tissue morphology and suppressors of invasion. *Cells Tissues Organs*, **149(3)**, 165-169.

Biegging KT, Mello SS, Attardi LD (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*, **14(5)**, 359.

Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Vogelstein B (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, **282(5393)**, 1497-1501.

Chang NS, Pratt N, Heath J, Schultz L, Sleve D, Carey GB, Zevotek N (2001). Hyaluronidase induction of a WW domain-containing oxidoreductase that enhances tumor necrosis factor cytotoxicity. *J of Biol Chem.*, **276(5)**, 3361-3370.

Devlin TM (2006). Text Book of Biochemistry with clinical correlations, 6th ed., (pp. 185), Wiley-Liss.

Franke WW, Heid H, Zimbelmann R, Kuhn C, Winter-Simanowski S, Dörflinger Y, Rickelt S (2013). Transmembrane protein PERP is a component of tessellate junctions and of other junctional and non-junctional plasma membrane regions in diverse epithelial and epithelium-derived cells. *Cell & tissue res.*, **353(1)**, 99-115.

Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Birchmeier W (1991). E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J of cell biol.*, **113(1)**, 173-185.

Gabriel JA (2007). *The Biology of Cancer*, 2nd Edition, John Wiley and Sons Ltd., p: 37-40.

Gasco M, Shami S, Crook T (2002). The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res.*, **4(2)**, 70.

Hargis AM (1995). *Cutaneous Neoplasia*. In: Thomson's Special Veterinary Pathology. Carlton W. W., McGavin M. D. (Eds), 2nd Edition, Mosby inc.. p.: 504-509

Harris CC (1996). Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *JNCI: J Nat Cancer Ins.*, **88(20)**, 1442-1455.

Milli ÜH, Hazıroğlu R (1997). *Veteriner Patoloji*. Cilt 2, Medipress, s:729-731.

Ho WC, Fitzgerald MX, Marmorstein R (2006). Structure of the p53 core domain dimer bound to DNA. *J Biol Chem.*, **281(29)**, 20494-20502.

Jung U, Ley K (1999). Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin. *J Immun.*, **162(11)**, 6755-6762.

Kaelin WG (1999). The p53 gene family. *Oncogene*, **18(11)**, 77015.

Kemler R (1992). *Classical cadherins*. In *Seminars in cell biology* **3(3)**, Academic Press, p: 149-155

Kishore K, Ghazvini S, Char DH, Kroll S, Selle J (1996). p53 gene and cell cycling in uveal melanoma. *Am j ophthal*, **121(5)**, 561-567.

Kong CS, Cao H, Kwok S, Nguyen CM, Jordan RC, Beaudry VG, Le QT (2013). Loss of the p53/p63 target PERP is an early event in oral carcinogenesis and correlates with higher rate of local relapse. *Oral surg, oral med, oral pathol and oral radiol*, **115(1)**, 95-103.

Lee E (1991). 13th San Antonio Breast Cancer Symposium Plenary Lecture Tumor Suppressor Genes-A New Era For Molecular Genetic Studies Of Cancer.

Lee SW (1996). H-cadherin, a novel cadherin with growth inhibitory functions and diminished expression in human breast cancer. *Nat med*, **2(7)**, 776.

Levine AJ, Finlay CA, Hinds PW (2004). P53 is a tumor suppressor gene. *Cell*, **116**, 67-70.

Lin YL, Sengupta S, Gurdziel K, Bell GW, Jacks T, Flores ER (2009). p63 and p73 transcriptionally regulate genes involved in DNA repair. *PLoS gen*, **5(10)**, e1000680.

Marques MR, Horner JS, Ihrle RA, Bronson RT, Attardi LD (2005). Mice lacking the p53/p63 target gene Perp are resistant to papilloma development. *Cancer res.*, **65(15)**, 6551-6556.

Meek DW (2009). Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response?. *Nat Rev Cancer*, **9(10)**, 714.

Meuten DJ (Ed.). (2016). *Squamous Papilloma and Fibropapilloma In: Tumors in domestic animals*, John Wiley & Sons. p: 445-449

Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*, **398(6729)**, 708.

Moll UM, Slade N (2004). p63 and p73: Roles in Development and Tumor Formation11National Cancer Institute. *Mol cancer res.*, **2(7)**, 371-386.

Nagafuchi A, Shirayoshi Y, Okazaki K, Yasuda K, Takeichi M (1987). Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature*, **329(6137)**, 341.

Ozawa M, Ringwald M, Kemler R (1990). Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc of the Nat Acad of Sci.*, **87(11)**, 4246-4250.

Özsoy ŞY, Özyildiz Z, Güzel M (2011). Clinical, pathological and immunohistochemical findings of bovine cutaneous papillomatosis. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.*, **58**, 161-165

Prives C, Manfredi JJ (1993). The p53 tumor suppressor protein: meeting review. *Genes & develop.*, **7(4)**, 529-534.

Rodriguez FJ, Lewis-Tuffin LJ, Anastasiadis PZ (2012). E-cadherin's dark side: possible role in tumor progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Rev Cancer*, **1826(1)**, 23-31.

Schulz W (2005). Molecular biology of human cancers: an advanced student's textbook. *Sprin Sci & Business Media*.

Tan Y, Luo R (2009). Structural and functional implications of p53 missense cancer mutations. *PMC biophysics*, **2(1)**, 5.

Varley JM, Evans DG, Birch JM (1997). Li-Fraumeni syndrome--a molecular and clinical review. *British J Cancer*, **76(1)**, 1.

Velculescu VE, El-Deiry WS (1996). Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clin chem.*, **42(6)**, 858-868.

Yamaguchi Y, Watanabe H, Yrdiran S, Ohtsubo K, Motoo Y, Okai T, Sawabu N (1999). Detection of mutations of p53 tumor suppressor gene in pancreatic juice and

its application to diagnosis of patients with pancreatic cancer: comparison with K-ras mutation. *Clin cancer Res.*, **5(5)**, 1147-1153.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Bilal ÜLGENOĞLU
Doğum Yeri ve Yılı : Diyarbakır 02.10.1989
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Telefon No : 05345495418
Elektronik Posta : vetcandostum@gmail.com
İletişim Adresi : Şekerhane Mahallesi Küllüoğlu Sokak
No 1-b Alanya/Antalya



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):
Lisans: Harran Üniversitesi 2013
Yüksek Lisans: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi (Halen devam ediyor.)