

Safra Kesesinin Metaplazi-Displazi-Karsinom Sekansında p16 ve p21 İmmünreaktivitesi

p16 and p21 Immunoreactivity in Metaplasia-Dysplasia-Carcinoma Sequence of the Gallbladder

Ebru AKAY,^a
 Ganime ÇOBAN,^b
 Kemal DENİZ,^c
 Tahir Ercan PATIROĞLU,^c
 Abdurrahman AKAY,^d
 Ferhan ELMALI^e

^aTıbbi Patoloji Laboratuvarı,
 Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
 Kayseri

^bTıbbi Patoloji AD,
 Bezmialem Vakıf Üniversitesi
 Tıp Fakültesi, İstanbul

^cTıbbi Patoloji AD,

^eBiyostatistik AD,
 Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi,
 Kayseri

^dGenel Cerrahi Kliniği,
 Ağrı Devlet Hastanesi, Ağrı

Geliş Tarihi/Received: 20.01.2014
 Kabul Tarihi/Accepted: 26.04.2014

Yazışma Adresi/Correspondence:
 Ebru AKAY
 Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
 Patoloji Laboratuvarı, Kayseri,
 TÜRKİYE/TURKEY
 ebruakay77@yahoo.com.tr

ÖZET Amaç: Biliyer sistemde kanser gelişim basamakları net olarak aydınlatılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, safra kesesi karsinomlarında da mideye görülen intestinal metaplaziye benzer şekilde metaplazi-displazi-karsinom sekansının bulunup bulunmadığı ve p16 ile p21 immünohistokimyasal belirleyicilerin bu sekans içerisinde rolü olup olmadığının araştırılmasıdır. **Gereç ve Yöntemler:** 2004-2011 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalında normal histolojik sınırlarda safra kesesi (n=18), metaplazi (n=22), displazi (n=3) ve karsinom (n=30) tanıları almış toplam 73 olgu incelemeye alındı. Yirmi iki metaplazi olgusuna tümör alanlar çevresinde görülen altı adet metaplazi dâhil edilerek, toplam 28 metaplazi olgusu değerlendirildi. Displazi olgularının üçü bu tanıyı almış olup, diğer 14 olgu adenokarsinom olgularının preparatları arasından, kansere komşu mukozadan seçildi. Tüm olgulara immünohistokimyasal olarak p16 ve p21 uygulandı. **Bulgular:** Bu çalışmada, normal epitelde p16 ile boyanma olmadı. Metaplazi, displazi ve karsinom olgularında ise değişen oranlarda p16 ekspresyonu görüldü. Normal epitel ile diğer tüm olgular p16 açısından değerlendirildiğinde normal epitelde boyanma olmaması istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,000). Normal epitele sahip tüm olgularda p21 ekspresyonu izlenirken metaplaziden displaziye doğru p21 ekspresyonu olan olguların sayısında ve boyanma oranlarında azalma görülmesi istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,000). Ayrıca, p16 ve p21 normal epitelde ve displazi olgularında birlikte değerlendirildiğinde p16 ile normal epitele oranla displazi olgularında boyanma oranlarında artış olması ve p21 ile displazilerde boyanma oranlarının normal epitelde displaziye doğru azalması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,001). **Sonuç:** Normal safra kesesi epiteline oranla lezyonlardaki p21 ekspresyon kaybı ve p16 overekspresyonunun varlığı karsinogenezdeki çok aşamalı gelişimin evreleri olarak yorumlandığı zaman bulgular metaplazi-displazi-karsinom sekansını desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Safra kesesi tümörleri; siklin bağımlı kinaz inhibitörü p16; siklin bağımlı kinaz inhibitörü p21; immünohistokimya

ABSTRACT Objective: Cascade of cancer development hasn't been fully elucidated in biliary system. The aim of the present study was to investigate whether there is a metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence as in the intestinal metaplasia seen at stomach and whether immunohistochemical markers, p16 and p21, have a role in this sequence. **Material and Methods:** 73 cases, which were diagnosed as gallbladder in normal histological range (n=18), metaplasia (n=22), dysplasia (n=3) and carcinoma (n=30) at Pathology Department Erciyes University, Medicine School, between 2004 and 2011, were reviewed. Overall 28 metaplasia cases were evaluated by adding 6 metaplasia findings observed peritumoral areas to original 22 metaplasia cases. Of the dysplasia cases, 3 were originally diagnosed as dysplasia, while further 14 cases were selected among adenocarcinoma preparations, which were obtained from adjacent mucosa. All cases were evaluated for p16 and p21 by immunohistochemistry. **Results:** In this study, no p16 staining was present in normal epithelium; however, varying degrees of p16 expression was seen in cases with metaplasia, dysplasia and carcinoma. When normal epithelium and all other cases were considered in terms of p16 staining, absence of staining in normal epithelium found to be significant (p=0.000). p21 expression was observed in all cases with normal epithelium, while number of cases with p21 expression and staining degree were decreased gradually, as being highest in metaplasia and lowest in dysplasia; this finding was also significant (p=0.000). Furthermore, when p16 and p21 were assessed in combination in cases with normal epithelium or dysplasia, presence of an increase in the degree of p16 staining and number of p16 positive cases was found to be significant, whereas a gradual decrease from normal epithelium to dysplasia in the degree of p21 staining was considered as significant (p=0.001). **Conclusion:** In this study, loss of p21 expression and overexpression of p16 supports metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence, when these findings are interpreted as the phases of multi-step development in carcinogenesis.

Key Words: Gallbladder neoplasms; cyclin-dependent kinase inhibitor p16; cyclin-dependent kinase inhibitor p21; immunohistochemistry

Safra kesesi karsinomları genellikle biliyer, intestinal, foveolar veya skuamoz diferansiyasyon gösteren, safra kesesi epitelinden kaynaklanan malign neoplazmlardır. Gastrointestinal sistem içerisinde görülen karsinomlar arasında dördüncü sıklıktadır. Olguların çoğu altı ve yedinci dekadlardadır. Kadınlarda erkeklere oranla üç-dört kat daha sık görülmektedir.^{1,2}

Safra kesesi karsinomlarının insidansı ülkelere göre değişiklik göstermekle birlikte, aynı ülke içerisindeki farklı etnik gruplarda da değişmektedir.³ Etiyolojide en önemli risk faktörleri genetik, taşlar ve anormal koledokopankreatik birleşimdir. Safra kesesi tümörleri diğer malign tümörler ile karşılaştırıldığında etiyojisi ve patogenezi hakkında daha az bilgi sahibi olunan tümörlerdir. Tanı zorluğu ve ileri evrelerde bulunması bu tümörlerin tedavisini zorlaştırmaktadır.⁴

Hücre siklusu, DNA tamiri ve apoptozda rolü olan, içerisinde p16 ve p21'in de bulunduğu hücre siklus kontrol mekanizmalarında meydana gelen defektlerin karsinogenezde rolü olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmanın amacı, safra kesesi karsinomlarının öncü lezyonları arasında metaplazilerin yerini olup olmadığını, metaplazi, displazi ve karsinom olgularında immünohistokimyasal olarak p16 ve p21 ekspresyonları açısından farklılığın anlamlı olup olmadığını araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmada 2004-2011 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalında normal histolojik sınırlarda safra kesesi (n=18), metaplazi (n=22), displazi (n=3) ve karsinom (n=30) tanıları almış toplam 73 olgu retrospektif olarak tarandı ve incelemeye alındı.

Normal histolojik sınırlarda kolesistektomi tanısı alan olgulara ait preparatlar seçilirken, safra yolları ile ilgili herhangi bir hastalığı olmayan farklı nedenlerle kolesistektomi yapılmış olgular tercih edildi. Metaplazili olguların tamamı kolelitiazis nedeni ile opere edilmiş olup, kronik kolesistit, kronik aktif kolesistit ve ksantogranüloamatöz kolesistit tanıları almış olgular arasından seçildi. Yirmi iki metaplazi olgusuna tümör çevresinde görülen 6 adet metaplazi alanı dâhil edildi. Toplam 28 metaplazi olgusu değerlendirmeye alındı. Değerlen-

dirme yapılırken pilorik ve intestinal metaplazi alanlarını birlikte içeren üç olguda yaygın olan tip değerlendirildi. Displazi olgularının üçü bu tanıyı almış olup diğer 14 olgu adenokarsinom olgularına ait preparatlar arasından, kansere komşu mukozadan seçildi. Karsinom olguları rastgele seçilmiş olup 29'u adenokarsinom, biri indiferansiye karsinom tanıları almıştır. Bloklar seçilirken displazi alanları içerenler tercih edildi. Dördü metaplazili olgulara ait, biri tümör preparatında olmak üzere, toplam beş adet displazi ile karışabilecek rejenerasyon atipisi alanları değerlendirmeye dâhil edildi.

Metaplazi, displazi ve karsinom tanısı almış 55 olgu ve kontrol dokusu olarak 18 normal safra kesesi olmak üzere toplam 73 olguya ait formalin fikse parafine gömülmüş dokulardan 5 mikronluk kesitler yapıldı, poli-L-lizinle kaplı lamlara alındı. Primer antikorlar olarak p16 (BD Pharmingen, Klon G175-405, 1/20 dilüsyonda, 60 dakika) ile p21 (Novocastra Lyphilized Mause Monoclonal Antibody WAF1 Protein, Klon 4D10, 1/15 dilüsyonda, 90 dakika) uygulandı. Ventana BenchMark XT marka makinede boyama gerçekleştirildi.

Pozitif kontrol olarak p16 için serviksin skuamoz hücreli karsinomu, p21 için tiroid papiller karsinom ve derinin skuamoz hücreli karsinomuna ait dokular kullanıldı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda değerlendirildi. İmmünohistokimyasal değerlendirmede p16 için nükleer+sitoplazmik, p21 için nükleer boyanma dikkate alındı. 400 büyük büyütmede lezyonların en yoğun boyanma saptanan alanlarında ortalama 1000 hücre sayılarak, boyanma gösteren hücre sayısı yüzde değer olarak belirlendi. Bu değerler Tablo 1'de belirtilen kriterlere göre skorlandı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesi SPSS (Scientific Package for Social Sciences) 15.00 programı ile yapıldı. Karşılaştırmalarda ki-kare testi, grafikler için Bar Charts metodu kullanıldı. p<0,05 değerleri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Bu çalışmada değerlendirilmeye alınan olguların 49 (%67,1)'u kadın, 24 (%32,9)'ü erkekti. Olguların lezyonlara göre dağılımı Tablo 2'de görülmektedir.

TABLO 1: p16 ve p21 için kullanılan skorlama tablosu.

İmmünohistokimyasal boyalar	Negatif	Skorlar		
		1 (+)	2 (+)	3 (+)
p16	Boyama yok	%10'dan az hücrede nükleer+sitoplazmik boyanma	%10-50 hücrede nükleer+sitoplazmik boyanma	%50'den fazla hücrede nükleer+sitoplazmik boyanma
p21	Boyama yok	%10'dan az hücrede nükleer boyanma	%10-50 hücrede nükleer boyanma	%50'den fazla hücrede nükleer boyanma

Yaş ortalaması normal histolojik sınırlarda kolesistektomili olgularda 56,3 (12-76 yaş) yılı, metaplazili olgularda 67,6 (33-84 yaş) yıl, displazili olgularda 64,3 (35-78 yaş) yıl ve tümürlü olgularda da 72,2 (49-88 yaş) yıl idi.

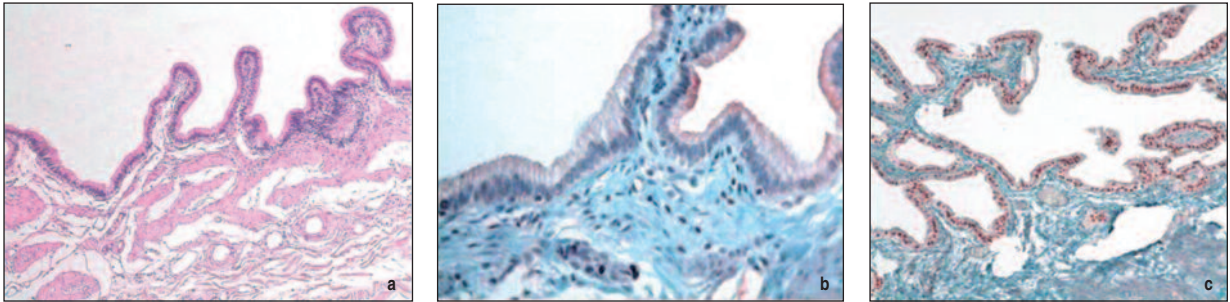
Toplam 28 metaplazi olgusunun 18 (%64,3)'inde pilorik metaplazi bulunurken 10 (%35,7)'unda intestinal metaplazi mevcuttu. Metaplazi olgularının kronik kolesistitler arasından seçilmiş olanlarının sayısı 22 idi ve bunların 15'i (%68,2) pilorik, 7'si (%31,8) intestinal tip metaplazi iken karsinoma komşu mukozada görülen metaplazilerin 3'ü (%50) pilorik, 3 (%50)'ü intestinal tipte idi. Kansere komşu mukozadaki metaplazilerde intestinal metaplazi oranı kansere komşu olmayan mukozadaki intestinal metaplazilere oranla daha sık idi.

TABLO 2: Olguların lezyonlara göre cinsiyet dağılımı.

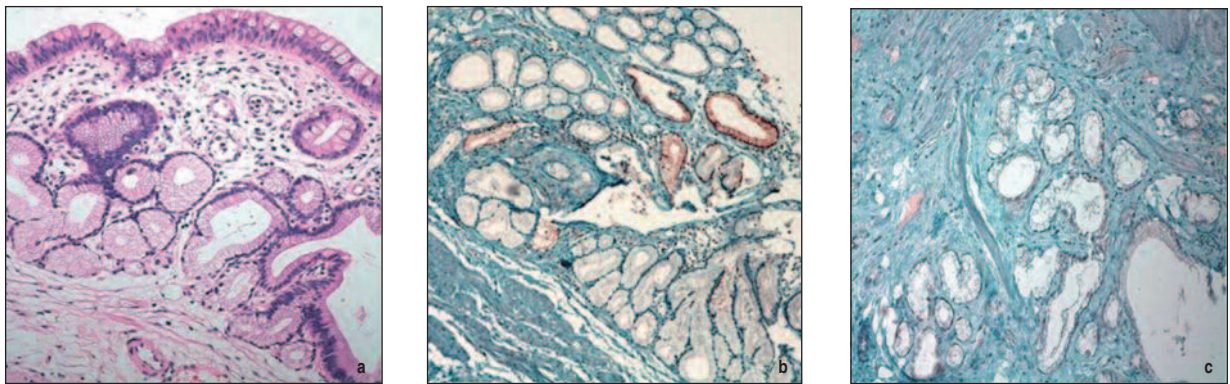
Cinsiyet	Normal	Metaplazi	Displazi	Karsinom	Toplam
Kadın	11	11	3	24	49
Erkek	7	11	-	6	24
Toplam	18	22	3	30	73

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

p16 ekspresyonu normal kolumnar epitelde izlenmedi (Resim 1a, b). Yirmi sekiz metaplazi olgusunun 15 (%53,6)'inde p16 ile 1(+) boyanma izlendi (Resim 2a, b). Pozitif boyanmanın elde edildiği 15 olgunun 6'sı intestinal, dokuzu pilorik metaplazi idi. Kalan 13 (%46,4) olguda boyanma olmadı. Metaplazilerde 2(+) ve 3(+) boyanma görülmedi. Karsinoma komşu mukozada bulunan altı metaplazi



RESİM 1: a) Normal histolojik sınırlarda safra kesesi (HE, x40); **b)** p16 ile normal epitelde nükleer boyanma izlenmedi (IHK, x200); **c)** p21 ile normal epitelde nükleer boyanma (IHK, x10).

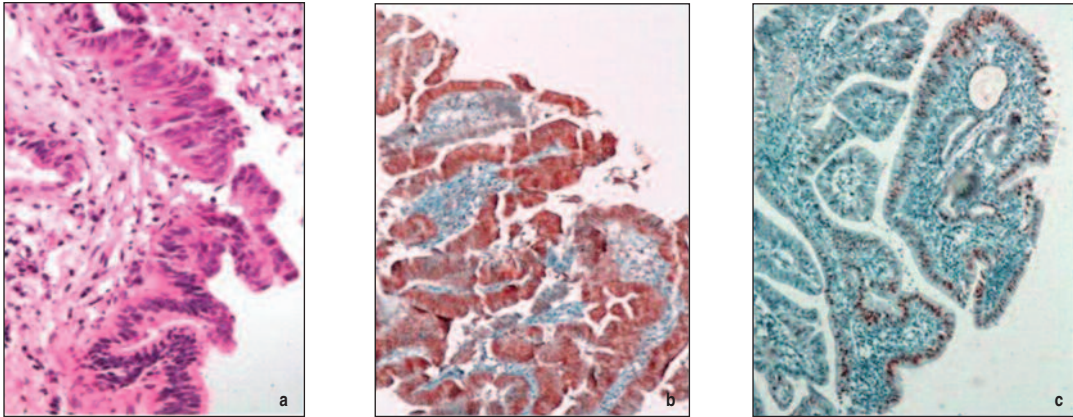


RESİM 2: a) Metaplazi alanı (HE, x100); **b)** p16 ile metaplazi alanında nükleer+sitoplazmik boyanma (IHK, x40); **c)** p21 ile metaplazi alanında nükleer boyanma (IHK, x100).

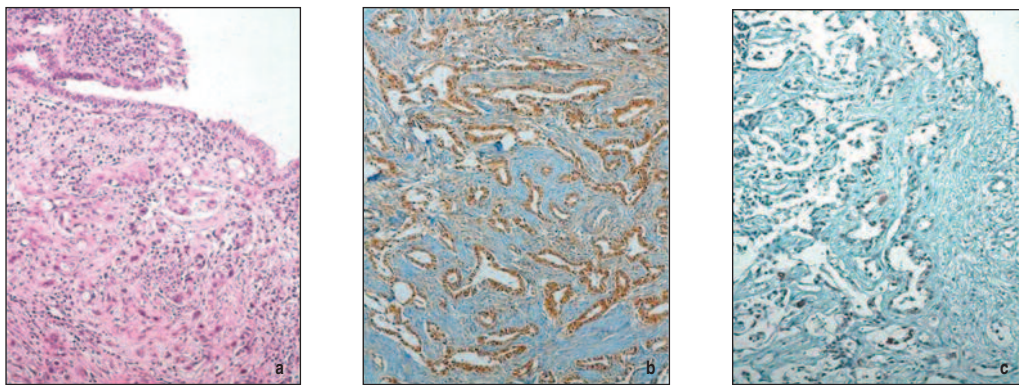
olgusunun (üç intestinal tip+üç pilorik tip) dördünde p16 ile 1(+) boyanma olurken, ikisinde boyanma görülmedi. Toplam üç adet olan intestinal metaplazilerin tamamında boyanma elde edilirken, pilorik tip metaplazi olgularından sadece birinde boyanma oldu. p16 ile displazili 3 (%17,6) olguda 1(+) boyanma, 1 (%5,9) olguda 3(+) boyanma elde edildi (Resim 3a, b). On üç (%76,5) olguda boyanma izlenmedi. Karsinomların, 5 (%16,7)'inde 1(+), 5 (%16,7)'inde 2(+), 10 (%33,3)'unda 3(+) boyanma görüldü (Resim 4a, b). On (%33,3) olguda ise boyanma görülmedi. p16 ile normal epitelde boyanma olmaması; metaplazi, displazi ve karsinom olgularının boyanma oranları ve yoğunlukları ile karşılaştırıldığında gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,000$). Tüm olguların p16 ile boyanmalarına ait grafik Şekil 1'de görülmektedir.

p21 immünohistokimyasal boyası ile normal epitele sahip olguların 1 (%5,6)'inde 1(+), 9 (%50)'unda 2(+), 8 (%44,4)'inde 3(+) boyanma izlendi (Resim 1c).

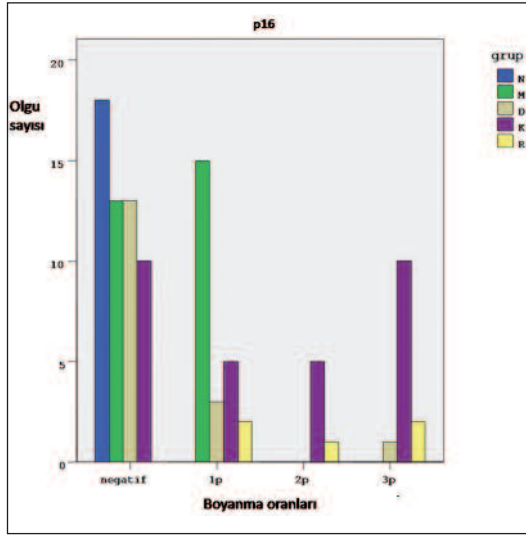
Normal epitelin tamamında p21 ile değişen oranlarda boyanma görüldü. Metaplazi olgularının 13 (%46,4)'ünde 1(+) boyanma izlenirken 2 ve 3(+) boyanma görülmedi (Resim 2c). On beş (%53,6) olguda boyanma izlenmedi. Kansere komşu mukozada görülen metaplazilerde p21 ile iki olguda 1(+) boyanma izlenirken, dört olguda boyanma olmadı. Pozitif olguların biri intestinal tip, diğeri pilorik tip metaplazi idi. Displazi olgularında p21 ile 11 (%64,7) olguda 1(+), 4 (%23,5) olguda 2(+) boyanma görüldü (Resim 3c). İki (%11,8) olguda boyanma izlenmedi. Karsinomlu olgularda p21 ile 20 (%66,7) olguda 1(+), 8 (%26,7) olguda 2(+) boyanma izlendi, 3(+) boyanma görülmedi (Resim 4c). p21 ile 3(+) boyanma sadece normal ve rejeneratif epitelde görüldü. Metaplazi, displazi ve karsinom vakalarında 3(+) boyanma izlendi. Ayrıca, p21 ile normal epitelin tamamında boyanma olması, metaplazi, displazi ve karsinom olgularındaki boyanma oranları ile karşılaştırıldığı zaman bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,000$).



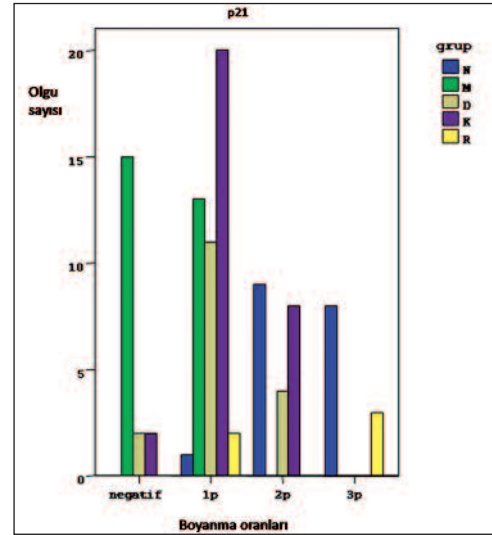
RESİM 3: a) Displazi alanı (HE, x200); b) p16 ile displazi alanında nükleer+sitoplazmik boyanma (IHK, x200); c) p21 ile displazi alanında nükleer boyanma (IHK, x100).



RESİM 4: a) Karsinom alanı (HE, x100); b) p16 ile karsinom alanında nükleer+sitoplazmik boyanma (IHK, x100); c) p21 ile karsinom alanında nükleer boyanma (IHK, x100).



ŞEKİL 1: Tüm olguların p16 ile boyanma durumunu gösteren grafik.
N: Normal epitel; M: Metaplazi; D: Displazi; K: Karsinom; R: Rejenerasyon atipisi; p: Pozitif.



ŞEKİL 2: Tüm olguların p21 ile boyanma durumunu gösteren grafik.
N: Normal epitel; M: Metaplazi; D: Displazi; K: Karsinom; R: Rejenerasyon atipisi; p: Pozitif.

Tüm olguların p21 ile boyanmalarına ait grafik Şekil 2'de görülmektedir.

p16 ve p21 immün boyalarının normal safra kesesindeki boyanma oranları karşılaştırıldığında sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,000$). Metaplazili alanlarda p16 ve p21 immünohistokimyasal boyanma oranları karşılaştırıldığında sonuç anlamlı bulunmadı ($p=0,593$). p16 ve p21 displazi olgularında birlikte değerlendirildiğinde, p16 ile normal epitelerle oranla displazi olgularında boyanma oranları ve sayılarında artış olması ve p21 ile displazilerde boyanma oranlarının normal epitelden displaziye doğru azalması istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,01$). Karsinom olgularındaki p16 ve p21 ekspresyon oranlarındaki artış ve azalış karşılaştırıldığında değerler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,000$). Rejenerasyon atipisinin görüldüğü epitelde iki boya grubu karşılaştırıldığında sonuç anlamlı değildi ($p=0,549$) (Tablo 3).

TARTIŞMA

Biliyer sistemde kanser gelişim basamakları net olarak aydınlatılamamıştır. Endodermden köken alan safra kesesinde gastrointestinal sistemin diğer organlarında beklenen birçok değişikliğin beklenmesi doğaldır. Midede görülen intestinal metaplaziye benzer şekilde, safra kesesinde de, büyük kısmını adenokarsinomların oluşturduğu kanserler ile intestinal metaplazi ilişkisi ve olası bir intestinal me-

taplazi, displazi, karsinoma in situ sekansı birçok araştırmacının ilgi konusu olmuş, bu konuda araştırmalar yapılmıştır.⁵⁻⁹

Safra kesesinde karsinom gelişimi için iki farklı histogenetik yol ileri sürülmüştür.¹⁰ Bunlardan ilki doğal epitelden karsinom gelişimi, diğeri ise metaplastik epitelden gelişim şeklindedir. Kanserli dokuya komşu mukozada sık olarak metaplazilerin bulunması, metaplazi varlığının kadınlarda ve ileri yaşta fazla olması, ek olarak intestinal metaplazilerin, displazilerin ve karsinomların fundusta daha sık görülmesi, metaplastik epitelin karsinom gelişiminde bir basamak olduğunu destekleyen bulgulardır.^{11,12} Her ne kadar metaplaziler ile safra kesesi karsinomları arasındaki biyolojik ilişki bilinmiyorsa da, metaplastik epitelin malign transformasyon kapasitesinin normal epitelden daha fazla olduğu iyi bilinmektedir.^{5,13,14} Safra kesesi karsinomlarına komşu mukozada her iki tip metaplazi görülmekle birlikte en çok intestinal metaplazi tanımlanmıştır.¹⁵⁻¹⁷ İntestinal metaplazi varlığı Kozuka ve ark.nın yaptığı çalışmada neoplastik olmayan safra kesesi örneklerinde %41,4 iken, kansere komşu mukozada %61,8 oranındadır.¹¹ Mukhopadyay ve ark., intestinal metaplazi ve displazi arasında anlamlı ilişki bulmuşlardır.¹⁴ Çalışmamızda ise karsinomlu keselerin komşu mukozasında displazi %46,6, metaplazi %20 oranında izlenmiştir. Bu oranlar literatürle karşılaştırıldığında daha düşüktür. Çalışmamızda, karsinoma

TABLO 3: p16 ve p21 boya grupları ile olgular arasındaki boyanma oranlarının karşılaştırılması.

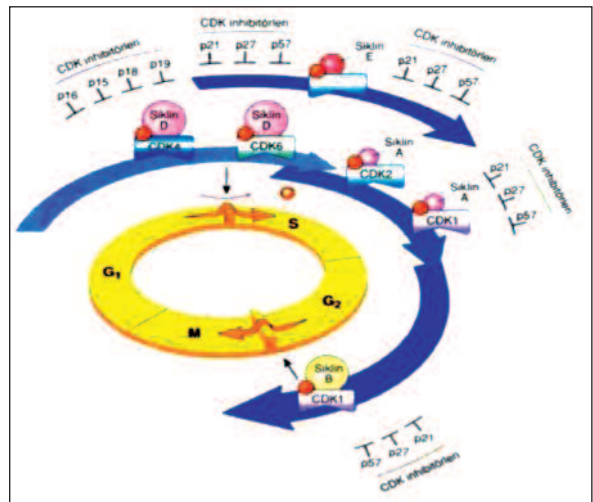
	p16	p21	p
Normal			
Negatif	18	0	0,000
1(+)	0	1	
2(+)	0	9	
3(+)	0	8	
Toplam	18	18	
Metaplazi			
Negatif	13	15	0,593
1(+)	15	13	
2(+)	0	0	
3(+)	0	0	
Toplam	28	28	
Displazi			
Negatif	13	2	0,001
1(+)	3	11	
2(+)	0	4	
3(+)	1	0	
Toplam	17	17	
Karsinom			
Negatif	10	2	0,000
1(+)	5	20	
2(+)	5	8	
3(+)	10	0	
Toplam	30	30	
Rej.atipisi			
Negatif	0	0	0,549
1(+)	2	2	
2(+)	1	0	
3(+)	2	3	
Toplam	5	5	

komşu mukozada görülen metaplazilerin intestinal metaplazi oranlarının neoplastik olmayan safra keselerinden yüksek oranda olması ise literatürle uyumludur. Epiteyal değişikliklerin fokal, multifokal veya yama tarzında olabildiği safra kesesinde Duarte ve ark.nın yaptığı çalışmada, gelişigüzel alınan bir kesitin incelenmesiyle 4 (%15,4) displazi, fundus bölgesinden alınan gelişigüzel bir kesitin incelenmesiyle 7 (%26,9) displazi, longitudinal olarak yapılmış 3 kesitin incelenmesiyle 9 (%34,6) displazi görülmesi örnek alımının ve örnek sayısının önemini işaret etmektedir.⁵ Prospektif çalışmalarda daha fazla örnekleme yapılmakta ve lezyonların en sık görüldüğü fundus-korpus bölgesinden örnekler alınmaktadır. Literatürle karşılaştırdığımızda daha düşük oranlarda displazi ve metaplazi alanı görme-

mizin nedenini çalışmamızın retrospektif olması ve sınırlı örnek sayısına bağlamaktayız.

Safra kesesinde metaplazi ve displazi alanlarının operasyon materyalinde rastlantısal olarak bulunması, progresyonları hakkında bilgi sahibi olmamızı ve invaziv karsinomların bunlardan gelişip gelişmediğini anlamamızı zorlaştırır. Ancak yapılan genetik çalışmalarda, metaplastik ve displastik hücreler ile karsinom hücrelerinin benzer moleküller anomaliler gösterdiği saptanmıştır.^{2,18}

Kanser gelişiminde kritik adımı hücre siklus kontrol mekanizmaları oluşturmaktadır. Hücre siklus kontrol noktasında meydana gelen defektler, kanser hücrelerindeki genetik instabilitenin en büyük nedenidir.^{19,20} Kendi internal kontrol noktalarına sahip kompleks bir mekanizma olan hücre siklusu iki temel kontrol noktası vardır. Bunlardan ilki G1/S geçişi, diğeri ise G2/M geçişidir (Şekil 3).²¹ Hücre siklusunun farklı evrelerinin düzenli olarak ilerlemesi siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve bunların inhibitörleri ile yönetilir. Hücre siklusu boyunca inaktif formda olan CDK'lar siklinler adı verilen protein ailesine bağlanarak aktive olurlar. Ortamda CDK inhibitörü yoksa siklus ilerlemeye devam eder, varsa siklusun ilerlemesi bloke edilir. Böylece siklinler normal fonksiyonları olan DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi için kritik olan protein aktivasyonunu gerçekleştiremez.^{19,21} CDKN2A (p16), 9. kromozomda 9p21. gende yerleşmektedir. p16 değişiklikleri karsinogeneze katkıda bulunmaktadır. Çünkü p16 protein üretiminde yetersizlik hücre siklusunda G1-S geçişi

**ŞEKİL 3:** Hücre siklus mekanizmasına ait şekil.²¹

esnasında CDK4 ve CDK6 üretimine ve ilişkili olarak siklin D1 inhibisyonuna neden olmaktadır. CDKN2A (p16) inaktivasyonu veya somatik edinsel delesyonu pankreatik karsinom, glioblastom, özofagus kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu, yumuşak doku sarkomu ve mesane kanserinde saptanmıştır. p16 gen delesyonu safra kesesi karsinomlarının yarısında görülmekte ve kötü prognozla birlikteliği bildirilmektedir.^{11,22,23}

p53, p16 inaktivasyonunun kronik kolesistit vakalarına oranla kansere komşu mukozada bulunan metaplazi alanlarında daha sık olması, kronik kolesistitlerde intestinal ve pilorik metaplazilerin yüksek sıklığı metaplazilerin epitelyal displazi oluşumuna neden olan yollardan biri olabileceği düşüncesini desteklemektedir.^{24,25} Çalışmamızda normal mukozanın p16 ile tüm olgularda negatif olduğu göz önüne alındığında, metaplastik epitelde pozitifliklerin olması normal hücre siklusunda değişikliklerin başladığının işareti olarak kabul edilebilir. Metaplastik epitelde hem p16 hem de p21 ile normal safra kesesi epiteliyle karşılaştırıldığında, boyanma oranlarında istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler saptanmıştır (p=0,000). Bu bulgular, metaplazinin kanser gelişiminde bir basamak olabileceğini desteklemektedir. Ayrıca, kolesistit olgularına oranla karsinomlu olgularda daha sık görülen intestinal metaplazilerde p16 ile boyanan olgu sayısının pilorik metaplazilerden fazla olması; intestinal metaplazinin displaziye, pilorik metaplaziden daha yakın olduğunu düşündürmektedir. Lynch ve ark.nın yaptığı çalışmada da displazi ve karsinomda p16 immünreaktivitesi, normal epitelde daha fazla bulunmuştur ve bu sonuçlar çalışmamızda elde edilen bulgular ile koreledir.²⁶ Bizim çalışmamızda, bu çalışmadan farklı olarak p16 ile displazi ve karsinom arasında boyanma oranlarının artışı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir (p=0,000).

p21 tümör supresör geni gibi davranan CDKN1A olarak da bilinen siklin bağımlı kinaz inhibitörüdür. CDKN1A geni (6p21.2) kromozomda lokalizedir.²⁷ Hasarlı DNA'nın hücre siklusu sırasında S fazına geçişini engeller. G1/S kontrol noktasında hücre siklusunun durdurulmasına p21'i uyaran p53 aracılık eder. G2/M kontrol noktasında hücre siklusunun durdurulması ise p53 bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla gerçekleşir. p53 bağımlı kontrol noktasında DNA ha-

sarına yanıt olarak p21'in önemli bir rol oynadığı bilinmektedir.^{28,29} p53 bağımsız olarak da büyüme faktörleri ve diferansiyasyonu indükleyen ajanlar aracılığı ile p21 ekspresyonu ortaya çıkabilir.^{21,30,31}

Puhalla ve ark., safra kesesi karsinomları ile ilgili çalışmalarında p21'in karsinomların %28'inde boyandığını belirtmişlerdir. p21'in tek başına safra kesesi karsinomlarında sağkalımı etkilediği gösterilememiş olmasına rağmen, p27 ve p53 ile birlikte değerlendirildiğinde hastaların sağkalımı ile korele olduğu gösterilmiştir. P53 ile korele edildiğinde p53 gen mutasyonu olan p21 ekspresyonu olmayanların sağkalım süresi p21 ekspresyonu olanlardan daha uzun bulunmuştur.²⁷ Fujii ve ark. çalışmalarında p53 tümör supresör gen ürünü ile p21 protein ekspresyonu arasındaki korelasyonu araştırmış, ancak aralarında ilişki bulamamışlardır.³² p53 durumu veya tümör hücrelerinin durumu (immortal, tümorojenik veya metastatik) ne olursa olsun, tümör hücrelerinde p21'in p53-bağımsız indüksiyon yolağının korunmuşu bildirilmektedir. p53 inaktivasyonu insan kanserlerinin yaklaşık %50'sinde tespit edilmiştir, bu tümör hücrelerinde p21'in p53-bağımlı indüksiyon yolağı bozulmaktadır. Prensipte olarak, p53 bağımsız yolağı üzerinden p21 aktivasyonu hücre döngüsü inhibisyonu ve DNA replikasyon inhibisyonu için fonksiyonel p53 gereksinimini ortadan kaldırabilir. Bu nedenle, p21 yolağı, p53 bağımsız indüksiyonu baskılayarak tümör hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması için potansiyel bir hedef olabilir.³³ Düşünüldüğünde Cip/Kip ailesinin gerek klinikle gerekse tümör gelişim basamakları ile ilişkisi hâlâ net olarak aydınlatılamamıştır ve araştırmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda, normal safra kesesinden karsinoma kadar var olduğunu düşündüğümüz sekans içerisinde p21 ekspresyon oranlarını değerlendirdik ve normal epitel ile karşılaştırdığımızda displazi ile aralarında anlamlı bir ekspresyon kaybı olduğunu gösterdik. Benzer şekilde Li ve ark., karsinom, displazi, adenom ve normal epitele sahip olguları çalışmalarına dâhil etmiş ve bizim çalışmamızda olduğu gibi normal epitelin tamamında p21 ile pozitif boyanma elde etmişlerdir.³⁴ Displazilerde boyanma izlenmemiş, adenom olgularının %57'si pozitif boyanmış ve karsinomların %51'inde pozitiflik görülmüştür. Prekanseroz lezyonların çevresi ve karsinom çevresindeki nonneoplastik mukozada

normal epiteldeki gibi boyanma izlenmiştir. Displazi, adenom ve karsinomlarda, normal epitele göre p21 ekspresyon kaybı safra kesesi karsinogenezindeki çok aşamalı gelişimin erken evresinde down regülasyon sonucu olabilir, çünkü p21 ekspresyon kaybı sıklıkla prekanseröz lezyonlarda görülmüştür.^{31,35} Bulgular birlikte değerlendirildiğinde, p21 ekspresyon kaybı hızlı büyüme gösteren agresif forma ilerleme işareti olarak yorumlanabilir.

SONUÇ

Bu çalışmada, normal epitelden karsinom gelişimine kadar olan süreçte metaplazilerin karsinoma

ilerlemede erken lezyonlar arasında yer alabileceğini destekleyen bulgular elde ettik. Son basamak olan karsinoma doğru p16 ekspresyon artışı, aynı basamaklarda bilinmeyen nedenlerle p21 ekspresyon kaybı olduğunu gösterdik. Yaptığımız bu çalışma ile bilinmeyenlerle dolu safra kesesi karsinogenezine katkıda bulunduğumuza inanıyoruz.

Teşekkür

Bu çalışma, TSU-10-3290 no'lu proje olarak Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Rosai J. Gallbladder and extrahepatic bile ducts. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 9th ed. Philadelphia: Mosby; 2004. p.1035-60.
- Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. Tumors of the gallbladder and extrahepatic bile ducts. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Vol. 3. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010. p.264-72.
- Henson DE, Albores-Saavedra J, Corle D. Carcinoma of the gallbladder. Cancer 1992;70(6):1493-97.
- Kimura W, Nagai H, Kuroda A, Morioka Y. Clinicopathologic study of asymptomatic gallbladder carcinoma found at autopsy. Cancer 1989;64(1):98-103.
- Duarte I, Llanos O, Domke H, Harz C, Valdivieso V. Metaplasia and precursor lesions of gallbladder carcinoma. Frequency, distribution, and probability of detection in routine histologic samples. Cancer 1993;72(6):1878-84.
- Matsumine T, Kubota Y, Iwasaki M, Yamaoka I, Sasaki H, Aoki M. [Metaplasia of the gallbladder mucosa in chronic cholecystitis--with special reference to duodenalization of the cholecystic mucosa (author's transl)]. Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi 1978;75(5):674-85.
- Iguchi K, Tanaka T, Inaba S, Yamagishi H, Hashimoto I, Ishibashi H. Histological study of biliary cancer: Relationship between CEA and biliary cancer with intestinal metaplasia. J Jpn Pract Surg Soc 1982;43(10):1090-5.
- Sato H, Ohmura K, Mizushima M, Ito J, Yoshioka K. [Metaplastic endocrine cells in various diseases of the gallbladder]. Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi 1982;79(11):2106-11.
- Kozuka S, Hachisuka K. Incidence by age and sex of intestinal metaplasia in the gallbladder. Hum Pathol 1984;15(8):779-84.
- Yamamoto M, Nakajo S, Tahara E. Carcinoma of the gallbladder: the correlation between histogenesis and prognosis. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 1989;414(2):83-90.
- Kozuka S, Kurashina M, Tsubone M, Hachisuka K, Yasui A. Significance of intestinal metaplasia for the evolution of cancer in the biliary tract. Cancer 1984;54(10):2277-85.
- Yamagiwa H, Tomiyama H. Intestinal metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence of the gallbladder. Acta Pathol Jpn 1986;36(7):989-97.
- Azadeh B, Parai SK. Argentaffin cells, intestinal metaplasia and antral metaplasia in carcinoma of the gallbladder. Histopathology 1980;4(6):653-9.
- Mukhopadhyay S, Landas SK. Putative precursors of gallbladder dysplasia: a review of 400 routinely resected specimens. Arch Pathol Lab Med 2005;129(3):386-90.
- Yamagiwa H. Mucosal dysplasia of gallbladder: isolated and adjacent lesions to carcinoma. Jpn J Cancer Res 1989;80(3):238-43.
- Sasatomi E, Tokunaga O, Miyazaki K. Precancerous conditions of gallbladder carcinoma: overview of histopathologic characteristics and molecular genetic findings. J Hepatobiliary Pancreat Surg 2000;7(6):556-67.
- Roa I, de Aretxabala X, Araya JC, Roa J. Preneoplastic lesions in gallbladder cancer. J Surg Oncol 2006;93(8):615-23.
- Adsay NV. Gallbladder, extrahepatic biliary tree, and ampulla. In: Mills SE, ed. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. Chapt. 38. 5thed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p.1600-51.
- Ekhholm SV, Reed SI. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. Curr Opin Cell Biol 2000;12(6):676-84.
- Kim WB, Han HJ, Lee HJ, Park SS, Song TJ, Kim HK, et al. Expression and clinical significance of cell cycle regulatory proteins in gallbladder and extrahepatic bile duct cancer. Ann Surg Oncol 2009;16(1):23-34.
- [Neoplasia]. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, eds. Sav A, Özdamar ŞO, çeviri editörleri. Robins and Cotran Hastalığın Patolojik Temeli. 7. Baskı. Chapter 7. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi; 2009. p.269-342.
- Dabbs D. Immunohistology of the pancreas, biliary tract, and liver. Diagnostic Immunohistochemistry; Theranostic and Genomic Applications. 3rd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2010. p.541-76.
- Kim YT, Kim J, Jang YH, Lee WJ, Ryu JK, Park YK, et al. Genetic alterations in gallbladder adenoma, dysplasia and carcinoma. Cancer Lett 2001;169(1):59-68.
- Wistuba II, Sugio K, Hung J, Kishimoto Y, Virmani AK, Roa I, et al. Allele-specific mutations involved in the pathogenesis of endemic gallbladder carcinoma in Chile. Cancer Res 1995;55(12):2511-5.
- Billo P, Marchegiani C, Capella C, Sessa F. [Expression of p53 in gallbladder carcinoma and in dysplastic and metaplastic lesions of the surrounding mucosa]. Pathologica 2000;92(4):249-56.
- Lynch BC, Lathrop LS, Ye D, Ma TY, Cerilli LA. Expression of the p16(INK4a) gene product in premalign and malignant epithelial lesions of the gallbladder. Ann Diagn Pathol 2008;12(3):161-4.
- Puhalla H, Wrba F, Kandioler D, Lehnert M, Huynh A, Gruenberger T, et al. Expression of p21Waf1/Cip1, p57Kip2 and HER2/neu in Patients with Gallbladder Cancer. Anticancer Research 2007;27(3B):1679-84.
- Sherr CJ. Cancer cell cycles. Science 1996; 274(5293):1672-7.
- Harris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. J Natl Cancer Inst 1996;88(20):1442-55.
- McCormick F. Signalling networks that cause cancer. Trends Cell Biol 1999;9(12):53-6.
- Palazzo JP, Mercer WE, Kovatich AJ, McHugh M. Immunohistochemical localization of p21 WAF1/CIP1 in normal, hyperplastic and neoplastic uterine tissues. Hum Pathol 1997;28(1):60-6.
- Fujii K, Yokozaki H, Yasui W, Kuniyasu H, Hirata M, Kajiyama G, et al. High frequency of p53 gene mutation in adenocarcinomas of the gallbladder. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1996;5(6):461-6.
- Chen YQ, Cipriano SC, Arenkiel JM, Miller FR. Tumor suppression by p21WAF1. Cancer Res 1995;55(20):4536-9.
- Li X, Hui AM, Shi YZ, Takayama T, Makuuchi M. Reduced p21(WAF1/CIP1) expression is an early event in gallbladder carcinogenesis and is of prognostic significance for patients with carcinomas of the gallbladder. Hum Pathol 2001;32(8):771-7.
- Polyak K, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Early alteration of cell-cycle-regulated gene expression in colorectal neoplasia. Am J Pathol 1996;149(2):381-7.