

Yazışma Adresi
Correspondence Address

Mete AKIN
Akdeniz Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji BD.
Antalya, Türkiye

drmeteakin@yahoo.com

Geliş Tarihi : Nisan 29, 2021
Received

Kabul Tarihi : Tem 11, 2021
Accepted

E Yayın Tarihi : Eylül 01, 2022
Online published

Bu makalede yapılacak atıf
Cite this article as

Denler Kılıç A, Koçkar MC, Akın M, Aslan Koşar P, Şahin Calapoğlu N. Ekstrahepatik Kolanjiokarsinomali Hastalarda Safra Sıvısında Tespit Edilen P53 Gen Mutasyonunun Tanı ve Prognozu Belirlemedeki Rolü *Akd Tıp D* 2022; 8(3): 326 - 332

Arzu DENLER KILIÇ
İlgaz Devlet Hastanesi,
İç Hastalıkları Kliniği,
Çankırı, Türkiye
ORCID ID: 0000-0003-4976-0812

Muhammed Cem KOÇKAR
Süleyman Demirel Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji BD.
Isparta, Türkiye
ORCID ID: 0000-0003-3541-7829

Mete AKIN
Akdeniz Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji BD.
Antalya, Türkiye
ORCID ID: 0000-0003-2393-7990

Pınar ASLAN KOŞAR
Süleyman Demirel Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD.
Isparta, Türkiye
ORCID ID: 0000-0003-2602-5145

Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD.
Isparta, Türkiye
ORCID ID: 0000-0002-7376-1607

Ekstrahepatik Kolanjiokarsinomali Hastalarda Safra Sıvısında Tespit Edilen P53 Gen Mutasyonunun Tanı ve Prognozu Belirlemedeki Rolü

The Role of P53 Gene Mutation Detected in Bile Fluid in the Diagnosis and Determining Prognosis of Patients with Extrahepatic Cholangiocarcinoma

ÖZ

Amaç:

Günümüzde yeni tanısal tekniklerin ortaya çıkmasına rağmen ekstrahepatik kolanjiokarsinoma tanısını koymak ve cerrahi öncesi değerlendirmesini yapmak oldukça güçtür. Bu çalışmada ekstrahepatik kolanjiokarsinoma tanısı konulan hastalarda safra sıvısında P53 gen mutasyonunun araştırılması ve bunun tanı ve prognozu belirlemede yol gösterici olup olamayacağının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem:

Çalışmaya ekstrahepatik kolanjiokarsinoma tanısı konulan 40 hasta ve kontrol gurubu olarak da malignite dışı nedenlerle endoskopik retrograd kolanjiopankreatografi (ERCP) yapılmış olan 40 hasta alındı. Bu hastaların ERCP sırasında alınan safra sıvılarında p53 tümör supresör geninin ekson 5 ve 8 nolu kodonlarında mutasyon araştırıldı.

Bulgular:

Kolanjiokarsinomali hastalardan oluşan grupta safra sıvısında p53 geninin 5. eksonunda 4 adet, 8. eksonunda 2 adet mutasyon saptandı. Malign ve benign gruplar karşılaştırıldığında mutasyonun varlığı açısından ekson 5'in 34007064 nolu ve 65389650 nolu kodonu ile ekson 8 in 78378222 nolu ve 35659787 nolu kodonunda anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p < 0,05$).

Sonuç:

Bu çalışmada ekstrahepatik kolanjiokarsinomali olgularda safra sıvısında p53 geninde ekson 5-8 de daha önce tanımlanmamış mutasyonlar tanımlanmıştır. Bu mutasyonların hepsinin klinikte kullanımında tanı koymaya yetmeyeceği, ancak tanıyı kuvvetlendirici bir kriter olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Sözcükler:

Ekstrahepatik kolanjiokarsinoma, P53 gen mutasyonu, Safra sıvısı, Endoskopik retrograd kolanjiopankreatografi

ABSTRACT

Objective:

Despite recent developments in diagnostic methods, diagnosis and preoperative evaluation of extrahepatic cholangiocarcinoma is difficult. This study aimed to investigate the P53 gene mutation in the bile fluid in patients diagnosed with extrahepatic cholangiocarcinoma, and to deter-

mine whether it could guide the diagnosis and prognosis.

Method:

Forty patients diagnosed with extrahepatic cholangiocarcinoma and 40 patients who underwent endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) for reasons other than malignancy as a control group were included in the study. Mutations in the codons of exon 5 and 8 of the p53 tumor suppressor gene were investigated in the bile fluids obtained during ERCP.

Results:

In the group of patients with cholangiocarcinoma, 4 mutations in the 5th exon and 2 mutations in the 8th exon of the p53 gene were detected in the bile fluid. When malignant and benign groups were compared, it was seen that there was a significant difference between the codon number 34007064 and number 65389650 of exon 5 and codon number 78378222 and number 35659787 of exon 8 in terms of the presence of mutation ($p < 0.05$).

Conclusions:

In this study, in cases with extrahepatic cholangiocarcinoma, mutations that were not previously identified in exon 5 and 8 of the p53 gene in bile fluid were identified. It was concluded that all of these mutations would not be sufficient for diagnosis, but could be strengthening findings in diagnosis.

Key Words:

Extrahepatic cholangiocarcinoma, p53 gene mutation, Bile fluid, Endoscopic retrograde cholangiopancreatography

GİRİŞ

Kolanjiokarsinoma (KK) safra yolları epitelinden köken alan, agresif bir kanser türüdür. Hepatobiliyer malignansilerin % 10-15'lik bir bölümünü oluşturmaktadır. Son yıllarda insidansı giderek artmakta olduğuna ilişkin raporlar yayınlamaktadır. KK, topografik olarak intrahepatik ve ekstrahepatik olarak sınıflandırılmaktadır. En çok görülen biçimi hiler tümörler ('Klatskin' Tümörü) olup bu tümörlerin sınıflandırılması için "Bismuth-Corlette" Sınıflaması kullanılmaktadır. Histolojik olarak KK'nın çoğu (> % 95) adenokarsinom'dur ve sklerozan (periduktal infiltrasyon), nodüler (kitle oluşturmuş) ve papiller (intraduktal büyüyen) olmak üzere üç grupta değerlendirilir (1).

Günümüzde yeni tanısal tekniklerin ortaya çıkmasına rağmen KK tanısını koymak ve cerrahi öncesi değerlendirmesini yapmak güç olabilir. İntrahepatik KK'nın diğer kanser ve metastazlarından, ekstrahepatik KK'nın iyi huylu safra kanalı darlıklarından (inflamatuvar, fibrotik, otoimmün vs) ayırt edilmesi önemlidir (2).

Bu çalışmada, görüntüleme ve histopatolojik bulguları ile ekstrahepatik KK tanısı konulan hastalarda endoskopik retrograd kolanjiopankreatografi (ERCP) sırasında alınan safra sıvısında P53 gen mutasyonunun araştırılması ve bunun tanı ve prognozu belirlemede yol gösterici olup olamayacağına belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma için Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Danışma Kurulu'ndan onay ve mali destek alınmıştır (Kara Sayı/No: 23/04, Tarih: 21.04.2011). Çalışmada hastalardan "bilgilendirilmiş olur" alınmış, Araştırma Yayın Etiği ve Helsinki Deklarasyonu ilkelerine uyulmuştur. Çalışma için hastane yönetiminden gerekli izinler alınmıştır. Bu makale Prof. Dr. Cem Koçkar'ın danışmanlığında Dr. Arzu Denler Kılıç'ın Süleyman Demirel Üniversitesi Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda yapmış olduğu uzmanlık tezinden üretilmiştir.

Hastaların Seçimi

Çalışmaya Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Kliniği'ne karın ağrısı veya sarılık ile başvuran ve yapılan tetkiklerinde kolestatik karaciğer enzimlerinde yükseklik, bilirubin yüksekliği ile birlikte tanısız amaçlı safra yollarına yönelik yapılmış radyolojik görüntülemelerde kısmi veya total olarak safra akışını engelleyen bir patoloji tespit edilen hastalar alındı. Hastalar safra yollarını tıkayan patolojiye göre benign (kontrol grubu) ve malign olmak üzere 2 gruba ayrıldı.

Malign gruptaki hastalarda tanı, tümörden veya tümör metastazlarından alınan histopatolojik örneklemeye ile birlikte görüntüleme yöntemleri ile safra yollarında tümöral lezyonların görülmesi ile konuldu.

ERCP Prosedürü

Tüm hastalara Gastroenteroloji Bilim Dalı Endoskopi Ünitesi'nde ERCP uygulandı. Hastalara işlem öncesi profilaksi amacıyla seftriakson 1 gr, işlem sırasında barsak kasılmalarını azaltmak amacıyla hiyosin N-metil bromür, bilinçli sedasyon için midazolam ve kardiyorespiratuar monitorizasyon uygulandı. ERCP işlemi Fujinon duodenoskop (ED-450XT5, Tokyo, Japan) ile tek endoskopist tarafından yapıldı. Tanısal kolanjiogram çekildikten sonra hastaların kanal içerisindeki safra sıvıları aspire edildi. Malign olan hastalarda ek olarak sitoloji fırçası ile tümör yüzeyi fırçalanarak sitolojik materyal alındı. Benign gruptaki hastalarda ise pasajı tıkayan taş, çamur, temizlendikten sonra hastanın koledok içerisindeki safra sıvısı aspire edildi.

Moleküler İnceleme

Tıbbi Genetik Laboratuvarında doku izolasyon kiti (instagene matrix) kullanılarak, ERCP sırasında alınan 1-2 ml safra sıvısından santrifüjle çöktürme prensibiyle bilier sistem hücreleri elde edildi. Bu hücrelerden, uygun sıcaklıkta inkübasyon, vorteks ve santrifüj aşamalarından sonra DNA izolasyonu tamamlandı. Elde edilen DNA'lar -20 0C'de saklanmış, otomatik analizör ile direkt DNA dizi analizi yöntemi kullanılarak ekson 5 ve 8'deki mutasyonlar tespit edildi.

İstatistiksel Değerlendirme

P53 immünohistokimyasal ekspresyonunun tümörün büyüklüğü, evresi, diferansiyasyonu, lenf nodu metastazı, uzak organ metastazı arasındaki ilişki ki-kare, Fisher's exact

test, Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test ve logistik regresyon modeli ile değerlendirilmiştir. P=0.05 anlamlılık düzeyi kullanılmıştır.

BULGULAR

Her iki grupta da 40 hasta olup kontrol grubu olan benign grupta hastaların çoğunda (25 hasta) koledok taşı mevcuttu. Malign gruptaki hastaların 24'üne distal, 16'sına proksimal ekstrahepatik KK tanısı konulmuştu (Tablo I).

Tablo I. Her iki gruptaki hastaların tanılarına göre dağılımı.

Tanı	Sayı (n)	%
Benign grup (n=40)		
Koledokta taş	25	62,5
Kolesistektomi sonrası benign darlık	6	15
Primer sklerozan kolanjit	4	10
Safra çamuru	1	2,5
Koledokoduedoenal fistül	1	2,5
Oddi fibrozisi	1	2,5
Kist hidatik safra yollarına rüptürü	1	2,5
Koledokta polip	1	2,5
Malign grup (n=40)		
Proksimal ekstrahepatik KK	16	40
Distal ekstrahepatik KK	24	60

Malign gruptaki 37 hastanın patolojik tanısı vardı. Bunlardan 21 hastada intraoperatif alınan doku piyeslerinden tanı konulmuş olup, sekiz hastada karaciğer metastazlarından alınan perkutan aspirasyon biyopsisi ile tanı konuldu. Bir hastamızda umblikus cildindeki metastatik tümöral lezyondan alınan biyopsi ile bir hastamızda laparoskopik alınan periton metastazından histopatolojik tanı konuldu. Dört hastamızda endoskopik ultrasonografi esnasında alınan ince iğne aspirasyon biyopsisi, iki hastamızda ise ERCP esnasında alınan fırça sitolojisi malign sitoloji olarak rapor edildi. Üç hastamızda histopatolojik tanı yoktu, ancak koledokta ekstrahepatik KK ile uyumlu ERCP ve bilgisayarlı tomografi görüntüleri mevcuttu.

Hastalarımızın tanı anında 26'sında evre 4 hastalık vardı ve palyatif tedaviler uygulandı. Ortalama yaşam süresi 196 gün olarak bulundu. Sadece bir vakada evre 2 KK vardı ve bu hastada distal ekstrahepatik KK tanısı ile cerrahi tedavi uygulandı. Hastanın postoperatif doku tanısı adenokarsinom olarak rapor edildi. Postoperatif kemoterapi verilmedi. On üç hastamız evre 3 KK tanısı aldı. Bu hastalarda da cerrahi tedavi uygulandı. Bir hasta postoperatif gelişen yara yeri enfeksiyonu ve sepsis nedeniyle ex olmuştur. Ortalama yaşam süresi 202 gün olarak bulundu (Tablo II).

Tablo II. Malign gruptaki hastalarda tümörün evresi, lokalizasyonu ve ortalama yaşam süreleri.

Tm evresi	Hasta sayısı	Tm lokalizasyonu	Ortalama yaşam süresi
Evre 1	0	-	-
Evre 2	1	1 Proksimal ekstrahepatik KK	1080 gün
Evre 3	13	13 Distal ekstrahepatik KK	202 gün
Evre 4	26	13 Distal ekstrahepatik KK 13 Proksimal ekstrahepatik KK	196 gün

Safra Sıvısının Moleküler İncelenmesi

Hastalarda ERCP ile alınan safra sıvısında P53 geninin 5. Eksonunda 4 adet mutasyon saptandı.

Bunlardan 1. mutasyon 28934576 nolu kodonda normal pozisyonda adenin bazı yerine guanin gelmesiydi. Bu durum malign gruptaki hastaların 38'inde (%95) görülürken 2 hastada (% 5) görülmedi. Benign gruptaki hastaların 36'sında (%80) görülürken 4 hastada (% 10) görülmedi.

Ekson 5 deki 2. mutasyon 34007064 nolu kodonunda sitozin bazının delesiye uğraması idi. Bu mutasyon malign gruptaki hastaların 34'ünde (% 85) görülürken 6 hastada (%15) izlenmedi. Benign gruptaki hastaların ise 35'inde (% 87,5) görülürken 5 hastada (%12,5) izlenmedi.

Ekson 5 deki 3. mutasyon 66759322 nolu kodonda adenozin bazının delesiye uğraması idi. Malign hastaların 36'sında (% 90) bu mutasyona rastlanıldı. Dört hastada (% 10) izlenmedi. Benign grupta ise hastaların 34'ünde (% 85) bu mutasyona rastlanıldı. Altı hastada (% 15) izlenmedi.

Ekson 5 deki 4. mutasyon 65389650 nolu kodonda timin bazının insersiyona uğraması idi. Malign grupta hastaların 39'unda (% 97,5) bu mutasyona rastlanıldı. Bir hastada (% 2,5) izlenmedi. Benign gruptaki hastaların 34'ünde (% 85) bu mutasyona rastlanıldı. Altı hastada (% 15) izlenmedi.

Ekson 8 de 2 bölgede mutasyona rastlanıldı. Birinci mutasyon 78378222 nolu kodonda normal pozisyonda adenin bazı yerine sitozin bazının gelmesiydi. Bu kolanjiokarsinomlu hastaların 32'sinde (% 85) görüldü, 8'inde (% 15) adenin bazı normal konumunu koruyordu. Benign grupta ise hastaların 33'ünde (% 82,5) bu mutasyon görüldü, 7'sinde (% 17,5) tespit edilmedi.

Ekson 8 deki 2. mutasyon 35659787 nolu kodonda normal pozisyonda guanin bazı yerine cadenin bazının gelmesiydi. Bu KK'lı hastaların 32'sinde (% 85) görüldü, 8'inde (% 15) görülmedi. Adenin bazı normal konumunu koruyordu. Benign gruptaki hastaların ise hastaların 20'sinde (% 50) görüldü, 20'sinde (% 50) tespit edilmedi.

Malign ve benign gruplar karşılaştırıldığında mutasyonun varlığı açısından Ekson 5 in 34007064 nolu kodonu, 65389650 nolu kodonu, ekson 8 in 78378222 nolu kodonu, 35659787 nolu kodonunda anlamlı farklılık vardı (p < 0,05). Bulgular Tablo III'de verilmiştir.

Tablo III. Benign ve malign grupta mutasyon yüzdeleri.

		Benign	Malign	Total	p
		n (%)	n (%)	n	
m28934576	mutasyon var	36 (49,3)	37 (50,7)	73	1,000
	mutasyon yok	4 (57,1)	3 (42,9)	7	
m34007064	mutasyon var	30 (44,8)	37 (55,2)	67	0,034
	mutasyon yok	10 (76,9)	3 (23,1)	13	
m66759322	mutasyon var	31(45,6)	37 (54,4)	68	0,060
	mutasyon yok	9 (75)	3 (25)	12	
m65389650	mutasyon var	32 (45,1)	39 (54,9)	71	0,029
	mutasyon yok	8 (88,9)	1 (11,1)	9	
m78378222	mutasyon var	19 (33,9)	37 (66,1)	56	<0,001
	mutasyon yok	21 (87,5)	3 (12,5)	24	
m35659787	mutasyon var	19 (32,8)	39 (67,2)	58	<0,001
	mutasyon yok	21 (95,4)	1 (4,6)	22	

Malign gruptaki 40 hastanın 22'si (%55) kadın, 18'i (%45) erkekti. Malign gruptaki hastaların cinsiyeti ile mutasyon bölgeleri karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanılmadı. Cinsiyetin malign gruptaki hastalardaki mutasyon bölgesi üzerine etkisi olmadığı düşünüldü (Tablo IV).

Tablo IV. Malign grupta mutasyonlara göre cinsiyet dağılımı.

		Erkek	Kadın	Total	p
		n (%)	n (%)	n	
m28934576	mutasyon var	18 (48,7)	19 (51,3)	37	0,238
	mutasyon yok	0	3 (100)	3	
m34007064	mutasyon var	17 (46)	20 (54)	37	1,000
	mutasyon yok	1 (33,3)	2 (66,7)	3	
m66759322	mutasyon var	17 (46)	20 (54)	37	1,000
	mutasyon yok	1 (33,3)	26 (66,7)	3	
m65389650	mutasyon var	18 (46,2)	21 (53,8)	39	1,000
	mutasyon yok	0	1 (100)	1	
m78378222	mutasyon var	16 (43,2)	21 (56,8)	37	0,579
	mutasyon yok	2 (66,7)	1 (33,3)	3	
m35659787	mutasyon var	18 (46,2)	21 (53,8)	39	1,000
	mutasyon yok	0	1 (100)	1	

Malign gruptaki hastaların mutasyonlara göre yaş ortalaması değerlendirildiğinde mutasyonu olan hastalarla mutasyonu saptanmayan hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo V).

Tablo V. Malign grupta mutasyonlara göre yaş ortalaması.

		n	Yaş (Ortalama ± SD)	p
		m28934576	mutasyon var	
	mutasyon yok	3	61,7±11,5	
m34007064	mutasyon var	37	65,2±12,9	0,625
	mutasyon yok	3	68,0±11,8	
m66759322	mutasyon var	37	65,3±12,9	0,625
	mutasyon yok	3	68,0±11,8	
m65389650	mutasyon var	39	65,7±12,8	0,435
	mutasyon yok	1	55,00	
m78378222	mutasyon var	37	65,5±13,1	0,959
	mutasyon yok	3	65,3±9,3	
m35659787	mutasyon var	39	65,7±12,8	0,435
	mutasyon yok	1	55,00	

Mutasyon olan ve olmayan hastaların tümör evreleri değerlendirildiğinde aralarında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmadı. Mutasyonun varlığı ile hastalığın evresi ilişkilendirilememiştir (Tablo VI).

Tablo VI. Malign grupta mutasyonlara göre tümör evrelemesi.

		Evre 2	Evre 3	Evre 4	p
		n (%)	n (%)	n (%)	
m28934576	mutasyon var	1 (2,8)	13 (30,5)	23 (66,7)	0,596
	mutasyon yok	0	0	3 (100)	
m34007064	mutasyon var	1 (2,8)	13 (30,5)	23 (66,7)	0,596
	mutasyon yok	0	0	3 (100)	
m66759322	mutasyon var	1(2,8)	13 (30,5)	23 (66,7)	0,596
	mutasyon yok	0	0	3 (100)	
m65389650	mutasyon var	1(2,6)	13 (28,9)	25 (68,5)	0,440
	mutasyon yok	0	0	1 (100)	
m78378222	mutasyon var	1(2,8)	13 (30,5)	23 (66,7)	0,596
	mutasyon yok	0	0	3 (100)	
m35659787	mutasyon var	1(2,6)	13 (28,9)	25 (68,5)	0,440
	mutasyon yok	0	0	1 (100)	

TARTIŞMA

Günümüzde görüntüleme yöntemlerinin oldukça gelişmiş olmasına rağmen ekstrahepatik KK görüntüleme yöntemleriyle tanı konulması zor bir hastalıktır. Bu nedenle insidansı giderek artan bu tümörde yeni tanı metodlarının geliştirilmesine çalışılmaktadır. Moleküler tanı yöntemleri son zamanlarda üzerinde durulan bir alternatiftir. Gelişmiş moleküler biyoloji, KK karsinogenezinde rol alan moleküler faktörlerin belirlenmesi ile önleme, tanı, tedavi ve prognoza katkı sağlamıştır (3).

Safra sıvısı kullanılarak yapılan önceki çalışmalarda, safra sitolojisinin sensitivitesi %33, spesifitesi %100 olarak bulunmuşken moleküler yöntemlerin sensitivitesi %25, spesifitesi %75 olarak bildirilmiştir. Sitoloji ile birlikte moleküler biyomarkerların çalışılmasıyla sensitivitenin %50'ye, spesifitenin %97'ye yükseldiği bulunmuştur (4). Fırça sitolojisinin malignite tespiti için duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif prediktif değeri ve negatif prediktif değeri sırasıyla % 60,% 89,% 59 ve % 89 bildirilmiştir. Bu rakamlar, P53 ve K-ras analizinin sonuçları eklenerek iyileştirilmiştir (5).

Tümör süpresör genlerin inaktive olması ve onkogenlerin aktive olmasıyla hücrelerde malign trasformasyon görülür ve tümör oluşur. Kimyasal ajanlar ile P53 tümör süpresör gen mutasyonu daha önce birçok insan malignitesinde gösterilmiştir. KK'da immünohistokimyasal olarak ve moleküler epidemiyolojik çalışmalarla P53 gen mutasyonu gösterilmiştir ve temel olarak ekson 5 ve 8'de çalışılmıştır (6). KK'nın patogenezinde çeşitli sinyal kaskadları, molekülleri ve genetik mutasyonlarındaki anormallikler rol oynar. KRAS, BRF, TP53, Smad ve p16INK4a dahil olmak üzere genlerde bir dizi yüksek oranda tekrarlayan mutasyonlarla karakterize edilir.

Kolon, akciğer, mesane, meme, karaciğer, özofagus, deri, over karsinomlarında yumuşak doku ve osteojenik sarkomlarda ayrıca lenfoma ve lösemilerde P53 gen mutasyonu sık görülmektedir (7). Solid tümörlerde P53 gen mutasyonu en sık kolorektal kanserlerde görülür ve hastalığın prognozunu yansıtmada önemli bir kriter olarak kabul edilmektedir (8,9). Pankreas malignitelerinde P53 gen mutasyonları yaklaşık %60 oranında görülmektedir.

Çoğu kanserde TP53 en sık mutasyona uğramış genlerden biridir. Genel olarak, TP53 mutasyonları tüm KK ların yaklaşık % 32'sinde mevcuttur. Ancak ekstrahepatik KK ve safra kesesi karsinomlarının intrahepatik KK'lerden daha yüksek bir TP53 mutasyonu sıklığına sahip olduğu bildirilmiştir (10). KK'da 90' dan fazla farklı P53 gen mutasyonu tanımlanmıştır. Bu durum toplumsal ve coğrafi farklılıklar ile farklı çevresel toksinlere maruziyet nedeniyle olabilir (11). Yüksek verimli genomikteki ilerlemelerden yararlanan son çalışmalar, KK'nin genetik yapısını ortaya çıkarmış ve altında yatan biyolojiji anlamamızı büyük ölçüde artırmıştır. Hücre döngüsü kontrolünde, hücre sinyal yollarında ve kromatin dinamiklerinde rol oynadığı bilinen TP53, KRAS, SMAD4, BRAF, MLL3, ARID1A, PBRM1 ve BAP1 gibi genlerdeki yüksek oranda tekrarlayan bir dizi mutasyon, bunların araştırılmasına yol açmıştır (12,13).

Literatürde KK'da P53 sekanslarıyla yayınlanmış beş farklı çalışmada ekson 5 ve 8'de %80'den fazla mutasyon saptanmıştır. Bu çalışmalarda çok az olgu incelenmiş ve 5. ve 8. eksnlara odaklanılmıştır (14). Hiçbir çalışmada P53'ün tüm eksnları incelenmemiştir. Dolayısıyla gözden kaçmış pek çok önemli mutasyon olabilir. P53 proteininin N-terminal transkripsiyonel fonksiyonları da önemlidir ve ekson 2-4 tarafından kodlanır. C-terminal ise DNA tamirinde ve apoptozisin uyarılmasında önemlidir ve ekson 9-11 tarafından kodlanır. İnsan kolanjiokarsinomunda insersiyon ve delesyonlar olabilir ancak en sık görülenler nokta mutasyonlardır ve bunlar N ve C terminallerinde görülür. İnsan kanser çalışmalarında insersiyon ve delesyonlar ekson 2-4 ve 9-11 de 5-8 e göre daha sık görülür. Çalışmamızda da ekson 5 ve 8'deki mutasyonlar araştırılmıştır. Ekson 5'deki 34007064 nolu kodonunda sitozin bazının delesyona uğraması ve 65389650 nolu kodonda timin bazının insersiyona uğraması, ekson 8'de ise 78378222 nolu kodonda normal pozisyonda adenin bazı yerine sitozin bazının gelmesi ve 35659787 nolu kodonda normal pozisyonda guanin bazı yerine cadenin bazının gelmesi KK'lı hastalarda anlamlı olarak daha sık bulundu.

Literatürde bugüne kadar yapılan çalışmalarda ortak saptanan nokta tümörün safhası ile gen değişikliği arasındaki pozitif ilişkidir. Xiao-Fang Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada KK'lı dokularda 36 hastanın 22'sinde P53 gen mutasyonları görülmüşken 19 hastada P53 proteini pozitif bulunmuştur. P53 proteininin kolanjik epitel hücrelerinin çekirdeğinde lokalize olduğu tespit edilmiş ayrıca P53 protein salınımı olanlar ve olmayanlar arasında diferansiyasyon ve invazyon açısından belirgin farklılıklar bulunmuştur. Bununla birlikte mutasyon olanlar ile olmayanlar arasında yaş, cinsiyet, differansiyasyon ve invazyon derecesi, lenf nodu metastazı, tümör evresi yönünden belirgin fark görülmemiştir (15). Bizim çalışmamızda da yaş, cinsiyet, lenf nodu metastazı, portal ven invazyonu, tümör evresi ile P53 gen mutasyonu ile anlamlı bir ilişki bulunamadı. Bu durumun bizim çalışmamızdaki hastaların çoğunun ileri evrede olması ve tüm mutasyon bölgelerinin hastalarda benzer sayıda ve yüksek oranda bulunuyor olması nedeniyle olabileceği düşünüldü. Ayrıca

çalışmamızda P53 ekson 5'deki 34007064 nolu bölgesi ve 66759322 nolu bölgesindeki mutasyonların tümör daha küçük boyutlardayken (ortalama 3 cm) ortaya çıktığı ancak bu mutasyonların hastalığın sağ kalımı üzerine etkisi olmadığı tespit edildi.

Gemcitabin bazlı kemoterapi, safra yolu kanserleri için mevcut standart tedavidir ve gemcitabine direnç, klinik zorluk olmaya devam etmektedir. TP53 mutasyonunun, KK'lı hastalarda zayıf klinikopatolojik özellikler ve hayatta kalma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (10).

P53 protein immünreaktivitesini tümör bölgesi, tümör derecesi ve hastaların sağkalımı ile karşılaştırmak için eski antikor ile elde edilen immünohistokimyasal sonuçlar kullanılmıştır. Proksimal tümörlerin yaklaşık üçte birinin (3/10) zayıf P53 immünopozitifliği eksprese ettiği bulunurken, alt orta bölge tümörlerinde orta immünopozitivite ve daha yüksek oran (18/29) gözlenmiştir. Son olarak ampulla (5/6) ve safra kesesi (8/11) tümörlerinde orta ve belirgin P53 immünopozitifliği gözlenmiştir. Ampulla ve safra kesesinin alt orta bölgesi tümörlerinde, düşük dereceli neoplazmalara kıyasla yüksek dereceli P53 pozitifliği anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Tam takip edilen vakalarda (11 alt orta bölge tümörü), P53 negatif tümörü olan hastaların medyan sağkalımı 25,7 ay iken, P53 pozitif tümörü olanların sağkalımı 5,2 ay tespit edilmiştir (16).

Literatürde P53 gen değişiklikleri ile cinsiyet ve yaş arasında ilişki oldukça sık oranda araştırılmıştır. Yaş KK prognozunda etkili faktörlerden birisidir ve özellikle 60 yaş ve üzerindeki olgularda prognoz daha ağır seyretmektedir (3). Çalışmamızda cinsiyet ile P53 pozitifliği arasında istatistiksel bir ilişki saptanmamıştır. Bu bulgu literatür ile uyumludur ve cinsiyetin P53 gen değişikliğini etkileyen bir faktör olmadığını düşündürmektedir. Yine çalışmamızda yaş ile P53 genindeki mutasyonlar arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır.

SONUÇ

Sonuç olarak çalışmamızda safra sıvısının moleküler incelemesi ile ekstrahepatik KK'lı hastalarda, P53 geninde ekson 5 ve 8'de daha önce tanımlanmamış bazı mutasyonlar tespit edilmiştir. Bu mutasyonların varlığı ile tümörün evresi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. P53 gen mutasyonlarının hepsinin klinikte kullanımında tek başına tanı kriteri olmaya yetmeyeceği, ancak tanıyı kuvvetlendirici bir kriter olabileceği düşünülmüştür.

Etik Komite Onayı:

Bu araştırma, ilgili tüm ulusal düzenlemelere, kurumsal politikalara ve Helsinki Bildirgesinin ilkelerine uygundur ve Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Danışma Kurulu'ndan onay alınmıştır (Kara Sayı/No: 23/04, Tarih: 21.04.2011).

Hasta Onamı:

Tüm katılımcıların hakları korunmuş ve Helsinki Deklarasyonuna göre prosedürlerden önce yazılı bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Yazar Katkıları:

Fikir - A.D.K., M.C.K.; Tasarım – A.D.K., M.C.K., M.A., P.A.K., N.Ş.C; Denetleme - A.D.K., M.C.K., M.A., P.A.K., N.Ş.C; Kaynaklar - A.D.K., M.C.K., M.A., P.A.K., N.Ş.C; Malzemeler - A.D.K., M.C.K., P.A.K., N.Ş.C; Veri Toplanması ve/veya İşlenmesi - A.D.K., M.C.K., M.A., P.A.K., N.Ş.C; Analiz ve/veya Yorum - A.D.K., M.C.K., M.A., P.A.K., N.Ş.C; Literatür Taraması - A.D.K., M.A., M.C.K; Yazıyı Yazan - A.D.K., M.A., M.C.K; Eleştirel İnceleme - M.C.K., M.A., P.A.K., N.Ş.C.

Çıkar Çatışması:

Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

Finansal Destek:

Çalışma için Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'nden mali destek alınmıştır (Kara Sayı/No: 23/04, Tarih: 21.04.2011).

1. Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. Cholangiocarcinoma. *Lancet* 2005; 366: 1303-14.
2. Strasberg SM, Drebin JA. Tumors of the biliary tree cholangiocarcinoma. In: Yamada T, Alpers DH, Laine L, Owyang C and Powell DW, eds. *Textbook of Gastroenterology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1999; 2201-18.
3. Banales JM, Cardinale V, Carpino G, Marzioni M, Andersen JB, Invernizzi P, Lind GE, Folseraas T, Forbes SJ, Fouassier L, Geier A, Calvisi DF, Mertens JC, Trauner M, Benedetti A, Maroni L, Vaquero J, Macias RIR, Raggi C, Perugorria MJ, Gaudio E, Boberg KM, Marin JJG, Alvaro D. Expert consensus document: cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European network for the study of cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; 13: 261-80.
4. Sturm PD, Rauws EA, Hruban RH, Caspers E, Ramsoekh TB, Huibregtse K, Noorduyt LA, Offerhaus GJ. Clinical value of K-ras codon 12 analysis and endobiliary brush cytology for the diagnosis of malignant extrahepatic bile duct stenosis. *Clin Cancer Res*. 1999; 5: 629-35.
5. Ponsioen CY, Vrouenraets SME, van Milligen de Wit AMM, Sturm P, Tascilar M, Offerhaus GJA, Prins M, Huibregtse K, Tytgat GNJ. Value of Brush Cytology for Dominant Strictures in Primary Sclerosing Cholangitis. *Endoscopy* 1999; 31: 305-9.
6. Maemura K, Natsugoe S, Takao SJ. Molecular mechanism of cholangiocarcinoma carcinogenesis. *Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2014; 21: 754-60.
7. Nigro MJ, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N. Mutations in the P53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989; 340: 705-7.
8. Veloso M, Wrba F, Kaseser K, Heinze G, Magalhaes A, Herbst BT. P53 gene status and expression of P53, mdm2, and p21Waf1/Cip1 proteins in colorectal cancer. *Virchows Arch* 2000; 437: 241-7.
9. Giatromanolaki A, Sivridis E, Stathopoulos GP, Fountzilas G, Kalafonos HP, Tsamandas A, Vrettou E, Scopa C, Polychronidis A, Simopoulos K, Koukourakis M. Bax protein expression in colorectal cancer: association with P53, bcl-2 and patterns of relaps. *Anticancer* 2001; 21: 253-60.
10. Chiao-En W, Yi-Ru P, Chun-Nan Y, Lunec J. Targeting P53 as a Future Strategy to Overcome Gemcitabine Resistance in Biliary Tract Cancers *Nov* 2020; 10: 1474.
11. Ito T, Sakurai-Yageta M, Goto A, Pairojkul C, Yongvanit P, Murakami Y. Genomic and transcriptional alterations of cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2014; 21: 380-7.
12. Chiang NJ, Shan YS, Hung WC, Chen LT. Epigenetic regulation in the carcinogenesis of cholangiocarcinoma. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015; 67: 110-4.
13. Kongpetch S, Jusakul A, Ong CK, Lim WK, Rozen SG, Tan P, Teh BT. Pathogenesis of cholangiocarcinoma: From genetics to signaling pathways. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2015; 29: 233-44.
14. Tullo A, D'Erchia AM, Sbisà E. Methods for screening tumors for P53 status and therapeutic exploitation. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2003; 3: 289-301.
15. Xiao-Fang Liu, Hao Zhang, Shi-Guang Zhu, Xian-Ting Zhou, Hai-Long Su, Zheng Xu, Shao-Jun Li. Correlation of P53 gene mutation and expression of P53 protein in cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4706-9.
16. Diamantis I, Karamitopoulou E, Perentes, E, Zimmermann A. P53 protein immunoreactivity in extrahepatic bile duct and gallbladder cancer: correlation with tumor grade and survival. *Hepatology* 1995; 22: 774-9.