

Klinik Çalışma

GASTROİNTESTİNAL STROMAL TÜMÖRLERDE İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE SAPTANAN P16 PROTEİN EKSPRESYONUNUN PROGNOSTİK ÖNEMİ

M. İlkey TOSUN¹, Pembegül GÜNEŞ¹, Güray KILIÇ¹, Fügen Vardar AKER¹

ÖZET

Gastrointestinal stromal tümörler (GİST), gastrointestinal sistemi tutan, normalde barsak duvarında bulunan intestinal pace maker hücrelerin (interstisyel Cajal hücreleri-ICC) veya bu hücrelerin prekürsörlerinin neoplastik transformasyonundan orijin aldığı düşünülen mezenkimal tümörlerdir. GİST patogeneğinde çeşitli hücre siklus regülatörleri özellikle p16 nın önemli rolü mevcuttur ancak, prognostik değeri hakkında tartışmalar devam etmektedir. p16 protein kaybının yüksek riskli GİST'ler ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Son zamanlardaki çalışmalarda p16 protein ekspresyonu kötü prognostik faktör olarak değerlendirilmektedir. Bu çalışmada; 1999-2009 yılları arasında Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesinde GİST tanısı alan 43 olguya ait parafin blok ve rapor arşivi incelendi. İmmunohistokimyasal yöntem ile p16INK4a çalışıldı. Sonuçlar ışık mikroskopisinde boyanma yoğunlukları açısından değerlendirildi. p 16 ile kuvvetli (+++) boyanma gösteren tüm olgular risk kategorizasyonuna göre yüksek risk grubuna dahildi. Çok düşük, düşük, intermediate risk grubundaki olguların hiçbirinde p16 ile kuvvetli boyanma saptanmadı. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı olup immunohistokimyasal yöntem ile p 16 ekspresyonunun belirlenmesinin GİST lerde bağımsız ve uygun bir prognostik pa-

rametre olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Gastrointestinal stromal tümör, p16

PROGNOSTIC IMPORTANCE OF IMMUNOHISTOCHEMICALLY DEFINED P16 PROTEIN EXPRESSION IN GASTROINTESTINAL STROMAL TUMORS ABSTRACT

Gastrointestinal stromal tumors(GIST) are mesenchymal tumors which are thought to be originated from neoplastic transformation of intestinal pace maker cells normally found on intestine wall (interstitial Cajal cells-ICC) or their precursors. In pathogenesis of GIST , different cell cycle regulators especially p16 have important role, however discussions about their prognostic importance stil continues. P16 protein loss is thought to be associated with high risk GIST. In recent studies p16 protein ekspresyon is assesed as bad prognostic factor. In this study, parafin blocks and report archive of 43 subjects diagnosed as GIST in Haydarpaşa Numune Hospital between years 1999-2009. P16INK4a is studied immunohistochemically. Results are evaluated as dye density.According to risk categorization , all subjects that are strongly(+++) painted with p16 are included in high risk group . None of the subjects in very low,low and intermediate risk

1. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü, İstanbul

group was painted strongly with p16. This result was statistically significant and evaluation of immunohistochemically defined p16 gene expression in GISTs can be accepted as an independent and proper prognostic parameter.

Key words: Gastrointestinal stromal tumor, p16

GİRİŞ

Gastrointestinal stromal tümörler (GİST), gastrointestinal sistemi tutan, normalde barsak duvarında bulunan intestinal pace maker hücrelerin (interstisyel Kaval hücreleri-ICC) veya bu hücrelerin prekürsörlerinin neoplastik transformasyonundan orijin aldığı düşünülen mezenkimal tümörlerdir¹. Prognozları tartışmalıdır. 5 cm den küçük tümörler genellikle 5/50hpf' den düşük mitoz oranı gösterirler ve genellikle klinik olarak benign davranışlıdır. Bununla birlikte az da olsa mitotik olarak inaktif olan tümörler metastaz yapabilirler⁽²⁾. Mitoz sayısı ve tümör çapına ek olarak DNA flow sitometrisinde anöploid³ nekroz varlığı⁴, ki67 proliferasyon indeks artışı gibi faktörler kötü prognostik faktör olarak değerlendirilmiş olsa da bunların önemine dair henüz fikir birliğine varılmamıştır². Bu nedenlerle malign-benign tümör terminolojisi yerine çok düşük risk, düşük risk, intermedier risk ve yüksek risk tanımlamaları kullanılmaya başlanmıştır.⁵

GİST patogeneğinde çeşitli hücre siklus regülatörleri özellikle p16'nın önemli rolü mevcuttur ancak, prognostik değeri hakkında tartışmalar devam etmektedir. Bir tür CDK inhibitör proteini olan p16 CDKN2A (aynı zamanda MTS-1, INK4A olarak da bilinir) gen ürünüdür. Kromozom 9p21'de kodlanır. p16 protein kaybının yüksek riskli GİST'ler ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir.⁶ ve son zamanlardaki çalışmalarda p16 protein ekspresyonu kötü prognostik faktör olarak değerlendirilmektedir.⁷

Bu çalışmanın amacı; GİST lerde risk kategorizasyonundaki en önemli 2 parametreden tümör çapı ve mitoz oranı ile p16 protein ekspresyonu arasındaki ilişkiyi saptamak; GİST lerde çok düşük risk, düşük risk, intermedier risk ve yüksek risk grupları arasında p16 boyanma oranları ve yoğunluğunu karşılaştırmak ve immunohistokim-

yasal yöntemle p16 protein ekspresyonunun gastrointestinal stromal tümörlerde bağımsız prognostik bir parametre olup olmayacağını saptamaktır.

Materyal ve Metod

Bu çalışmada 1999-2009 yılları arasında Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma hastanesinde GİST tanısı alan 36 ve GİST terminolojisinin tanımlanmasından önceki döneme ait malign stromal tümör, fusiform hücreli mezenkimal tümör ve leiomyosarkom tanısı alan 7 olguya ait lam, parafin blok ve rapor arşivi incelendi. Kesitler tanı ve prognostik parametreler açısından tekrar gözden geçirildi. Malign stromal tümör tanısı alan 4 hasta, fusiform hücreli mezenkimal tümör tanısı alan 2 hasta ve leiomyosarkom tanısı almış 1 hastaya ait parafin bloklarda immunohistokimyasal olarak CD117 (16P07neomarkers), SMA(MO851-Dako), Desmin (Cd33-Neomarkers), CD34 (QBEnd/10-Neomarkers), Ki67 (SP6-Neomarkers) ve p16 (CIN-tec p16 INK4A histology Kit) çalışıldı. GİST tanısı almış olan 36 olguya ait parafin bloklardan ise immunohistokimyasal olarak p16INK4a çalışıldı. Sonuçlar ışık mikroskopisinde boyanma yoğunlukları açısından değerlendirildi. p16 için pozitif kontrol olarak daha önce boyandığı bilinen invaziv skuamöz hücreli karsinom olgusu kullanıldı. Bu olguda boyanma hem sitoplazmik ve hem de nukleer olup, 3+ yoğunlukta idi. p16 için sonuçlar semikantitatif olarak değerlendirildi. Boyanma yoğunluğu: 0 dan 3+ 'e kadar değerlendirildi⁸. (0: %0-%10; 1: % 11 - %20 nukleer boyanma (sitoplazmik boyanma olsun ve ya olmasın)(Resim1); 2:%21 - %50 nukleer boyanma (sitoplazmik boyanma olsun ve ya olmasın)(Resim2); 3: % 50 den fazla nukleer boyanma (sitoplazmik boyanma olsun ve ya olmasın) (Resim3)) Ayrıca Ki67 proliferasyon indeksi en yoğun boyanma görülen alanda 1000 hücredeki nukleer pozitiflik yüzdesi olarak kaydedildi.

İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için NCSS 2007&PASS

Tablo 1: p16 boyanmasına ilişkin değerlendirmeler

	p 16				P	
	Boyanma Yok	Zayıf	Orta	Kuvvetli		
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS		
[^] Yaş	6,77±17,52	67,42±18,56	58,87±14,80	58,66±7,59	0,592	
^{**} Çap (Medyan)	6,33±4,23 (5,5)	9,88±8,43 (7,0)	6,05±1,75 (6,0)	14,5±5,29 (14)	0,011*	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)		
[*] Cinsiyet	Kadın	9 (%50,0)	3 (%42,9)	5 (%55,6)	3 (%33,3)	0,789
	Erkek	9 (%50,0)	4 (%57,1)	4 (%44,4)	6 (%66,7)	

*Oneway ANOVA test

**Kruskal Wallis test

* Ki-kare test

*p<0.05

2008 Statistical Software (Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma, frekans) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Oneway Anova testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde Mann Whitney U test kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi ve Mc Nemar testi kullanıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık p<0.05 düzeyinde değerlendirildi.

Bulgular:

1999-2009 tarihleri arasında yaşları 20 ile 89 arasında değişmekte olan; 20'si (%46.5) kadın ve 23'ü (%53.5) erkek olmak üzere GİST tanılı toplam 43 olgu incelendi. Olguların ortalama yaşları 60.69±15.42 idi. Biyopsi materyalinin; %95,3'ü (n=41) eksizyonel, %4.7'si (n=2) ise insizyonel biyopsiden oluşmakta idi. Tümörün yerleşim yeri incelendiğinde; %2.3'ünün (n=1) kalın barsakta, %51.2'sinin (n=22) midede, %32.6'sının (n=14) ince barsakta, %14'ünün (n=4) ise gastrointestinal dışı bölgede yerleştiği görülmektedir. Hücre tipi incelendiğinde; %67,4'ünün (n=29) iğsi, %23,3'ünün (n=10) mikst, %9,3'ünün (n=4) ise epiteloïd olduğu görülmektedir. Tümörlerin %14'ünde (n=6) hücresellik az, %2,3'ünde (n=1) orta, %83,7'sinde (n=36) ise belirgin dü-

zeydedir. Tümörlerin %25.6' sında (n=11) sitolojik atipi hafif düzeyde iken, %74.4'ünde (n=32) belirgin düzeydedir.

Fletcher ve ark. Nisan 2002'de yaptıkları çalışmada belirlenen GİST risk kategorizasyonuna göre olguların %7'si (n=3) çok düşük risk, %27.9'u (n=12) düşük risk, %11.6'sı (n=5) orta risk ve %53.5'i (n=23) ise yüksek risk grubunda bulunmaktadır.

p16 boyanma derecelerine göre tümör çapları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p<0.05). p16 boyası ile kuvvetli boyanan tümörlerin çapları, boyanmayan (p:0.002; p<0.01) ve orta düzeyde boyanan (p:0.003; p<0.01) tümörlerden anlamlı şekilde yüksektir. Diğer boyanma derecelerine göre tümör çapları anlamlı bir farklılık göstermemektedir. p16 boyanma derecelerine göre olguların cinsiyet dağılımları ve yaşları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05). (Tablo 1)

P16 boyanması ile risk kategorileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmaktadır (p<0.05). P16 boyanma derecesi arttıkça risk de artmaktadır. (Tablo 2)

P 16 boyanması ile tümörün yerleşim yeri, hücre tipi, hücresellik, sitolojik atipi kanama, nekroz ve ülserasyon arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p>0,05)

Tartışma

Gastrointestinal Stromal Tümörler (GİST), özefagustan anüse kadar tüm gastrointestinal kanal (GİK) boyunca ve omentum, mezenter, retroperitondan (GİK dışı alanlar) gelişebilen, interstisyel Kaja hücrelerinden kaynaklanan mezenkimal tümörlerdir⁹. GİST'ler genellikle 4. dekad sonrasında ortalama olarak 60'lı yaşlarda görülür¹. Bazı olgu serilerinde erkek cinsiyet hakimiyeti izlenirken, diğer serilerde cinsler arasında eşit dağılım gösterilmiştir¹⁰. Bizim çalışmamızda 43 olgu-

nun 20 si kadın (%46,5) ve 23 ü (%53,5) erkekti. Olguların yaşları 20-89 arasında değişmekte olup ortalama yaş 60.69 +/- 15.42 idi.

Yapılan farklı çalışmalarda, GİST'lerin GİK ve GİK dışı alanlarda görülme sıklıkları araştırılmıştır. Fletcher ve ark.'nın⁵ yaptığı çalışmada bu oran, midede %50-60, ince barsakta %20-30, kalın barsakta %10, özefagusta %5, GİK dışı alanlarda %5 olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda tümörlerin %51,2 (n=22) si mide; %32,6 (n=14) sı ince barsak; %2,3 (n=1) kalın barsak ve %14 (n=4) ü gastrointestinal dışı bölgede lokalize idi. Kalın barsak yerleşimli tümör oranımız literatürden az olmakla birlikte GİK dışı alanlarda yerleşmiş olgu sayısı literatürden daha fazla (%14) bulunmuştur. Bu farkın, GİK dışındaki tümörlerin bir kısmının primer olmamasına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Yeterli klinik bilgi ve takip durumunda bu oranın farklı olabileceği düşünülmektedir. GİK kanal dışı yerleşimli 4 olgumuzun 3 tanesi omentum yerleşimli olup 1 tanesi presakral bölge yerleşimlidir Diğer oranlar literatür ile uyumlu bulunmuştur. Literatürde de az bir oranda görülen özefagus yerleşimli olgular, serimizde bulunmamaktadır¹¹.

Fletcher ve ark.'ı Nisan 2002'de, GİST risk kategorizasyonu ile ilgili bir araştırma yayınlamıştır. Tümör çapı ve mitoz sayısı kullanılarak GİST'leri 4 gruba ayıran (çok düşük risk, düşük risk, intermedier risk, yüksek risk) bir risk kategorizasyon tablosu oluşturulmuştur (Tablo 3)⁵. GİST'lerde p16 gen değişikliklerinin prognostik önemi hakkında tartışmalar hala devam etmektedir⁸. p16 ekspresyon

Tablo 2: P16 boyanmasına göre risk kategorileri değerlendirilmesi

	P 16				*p
	Boyanma Yok	Zayıf	Orta	Kuvvetli	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Risk					
Çok Düşük Risk	3 (%16,7)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	
Düşük Risk	6 (%33,3)	3 (%42,9)	3 (%33,3)	0 (%0)	0,034*
Orta Risk	2 (%11,1)	0 (%0)	3 (%33,3)	0 (%0)	
Yüksek Risk	7 (%38,9)	4 (%57,1)	3 (%33,3)	9 (%100)	

*Ki-Kare test

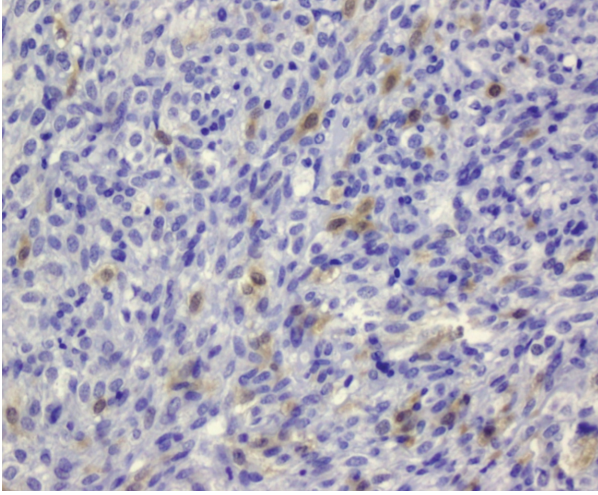
* p<0.05

kaybının kötü prognoz açısından anlamlı olduğuna dair var olan görüşlerin yanı sıra, p16 protein ekspresyonunun kötü prognostik faktör olduğuna dair çalışmalar da bulunmaktadır⁷. Bizim bu çalışmadaki amacımız da GİST' de immunohistokimyasal yöntem ile p 16 ekspresyonun saptanmasının prognostik bir parametre olarak kullanılabileceğini saptamaktır.

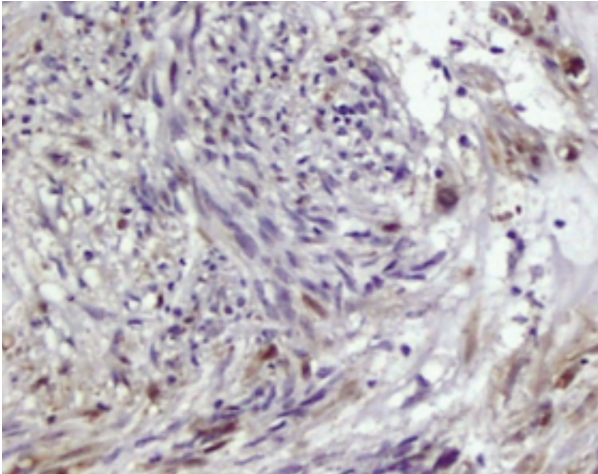
Literatürde p16 ekspresyonunun çeşitli insan tümörlerindeki rolüne ve prognostik anlamına dair çalışmalar mevcuttur. Aslında p16 ekspresyonu high grade meme ve high grade serviks intraepitelial neoplazi ve skuamöz-glandüler-küçük hücreli serviks karsinomlarında da GİST'lerdekine benzer şekilde kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur⁷. Karin ve ark.'nın¹² 60 olguluk serilerinde

Tablo 3: Fletcher ve ark.'nın (5), tümör çapı ve mitoz sayısına göre hazırladığı risk kategorizasyonu tablosu.

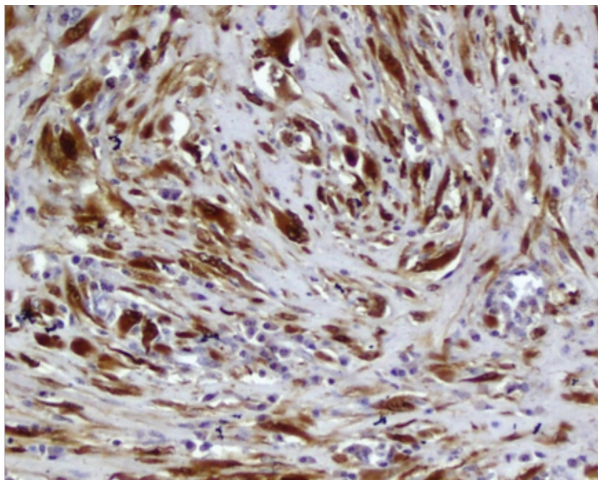
TÜMÖR ÇAPI	MİTOTİK ORAN
ÇOK DÜŞÜK RİSK	<2cm <5/50 BBA
DÜŞÜK RİSK	2-5cm <5/50 BBA
İNTERMEDİER RİSK	<5cm 6-10/50 BBA
5-10cm	<5/50 BBA
YÜKSEK RİSK	>5cm >5/50 BBA
>10cm	Herhangi bir mitotik oran
Herhangi bir boyut	>10/50 BBA



Resim 1: Gastrointestinal Stromal Tümörde Zayıf(+1) p16 Boyanması (x200)



Resim 2: Gastrointestinal Stromal Tümörde Orta(+2) Derecede p16 Boyanması (x200)



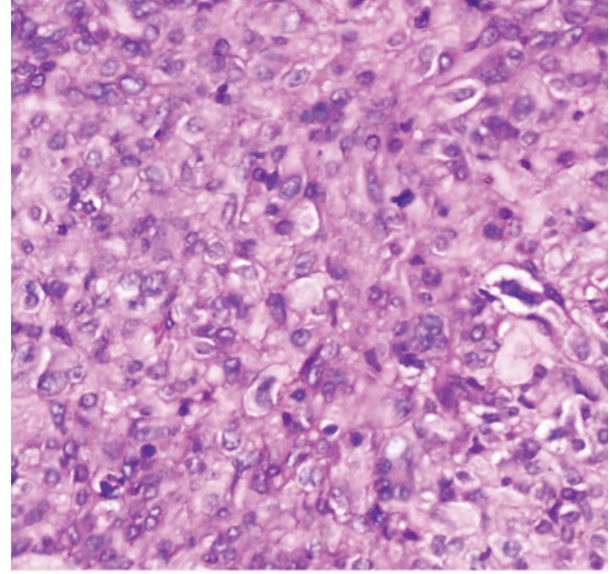
Resim 3: Gastrointestinal Stromal Tümörde Kuvvetli(+3) Derecede p16 Boyanması (x200)

p16 ekspresyonu hem immunhistokimyasal hem de western-blot analizi yöntemleri ile çalışılmıştır. Her iki yöntem ile de p16 ekspresyonu indifferansiye, high grade fenotipli ve östrojen reseptörü negatif olgularda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. p16 ekspresyonu progesteron reseptörü ile ters korelasyon göstermekte ve ki67 indeksi ile korele olarak artış göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada p16 ekspresyonunun klinik evre, c-erb B2 ekspresyonu, retinoblastom ekspresyonu ya da fosforilasyonu ile korelasyonu olmadığı gösterilmiştir. Pankreas adenokarsinomları, malign melanomlar, özefagusun yassı hücreli karsinomları, astrositomlar, over karsinomları, akciğer karsinomları, bazı lösemi ve lenfomalarda CDKN2A geninde delesyon, mutasyon ya da hipermetilasyon ile birlikte p16 ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı ya da tamamen kaybolduğu bildirilmektedir.^{13,14}

Bizim çalışmamızda olgularımızın %20,9u (n=9) kuvvetli (+++) ; %20,9 u (n=9) orta derecede (++) ve %16,3 ü (n=7) zayıf (+) olmak üzere % 58.1 (n=25)' inde p16 ekspresyonu saptandı. p 16 ile kuvvetli (+++) boyanma gösteren tüm olgular risk kategorizasyonuna göre yüksek risk grubuna dahilildi. Çok düşük, düşük, intermediate risk grubundaki olguların hiçbirinde p16 ile kuvvetli boyanma saptanmadı. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı olup immunohistokimyasal yöntem ile p 16 ekspresyonunun belirlenmesinin GİST lerde bağımsız ve uygun bir prognostik parametre olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Literatürde bu açıdan bizim çalışmamızı destekleyen çalışmalar olduğu gibi tam tersini savunan çalışmalar da mevcuttur. Sabah ve ark. ları 21 olguluk bir çalışmada p16 protein ekspresyon kaybının yüksek riskli GİST'ler ile bağlantılı olduğunu göstermişlerdir⁶. Çalışmanın ilk ayağında 21 olgu öncelikle p16 hem immunohistokimyasal yöntem ile hem de PCR tekniği ile heterozigosite kaybı açısından değerlendirmeye alınmıştır. İmmunreaktivitenin değerlendirilmesinde %20-80 arası boyanmayı heterojen boyanma olarak nitelendirilirken %80 den fazla boyanma pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada heterojen ve negatif boyanma anormal olarak kabul edilmiş, pozitif boyan-

ma ise yoğunluğa bakılmaksızın normal olarak tanımlanmıştır. Tüm düşük malign potansiyelli tümörler (8 olgu) p16 ile diffüz pozitif nükleer boyanma gösterirken tüm malign olgular (13 olgu) p16 ile negatif boyanma göstermiştir. Daha sonra bu 21 olgudan tümörün farklı bölgelerinden DNA ekskrete edilmiş ve PCR amplifikasyonu yöntemi ile DNA fragmentleri elde edilmiştir. Olgular mitotik oran ve boyutlarına göre low malign potansiyel (intermedier risk) ve malign (high risk) olarak iki gruba ayrılmıştır. Heterozigosite kaybı, düşük malign potansiyelli olguların hiçbirinde saptanmaz iken 1 olgu dışında malign olguların tamamında gözlenmiştir. İmmunohistokimyasal yöntem ile p16 pozitif boyanan 8 düşük malign potansiyelli olgunun hiçbirisi heterozigosite kaybı göstermemiştir. Bununla birlikte heterozigosite kaybı gösteren 12 olgunun tamamında p16 ekspresyon kaybı gösterilmiştir.

Yine aynı araştırmacılar 21 tanesi ilk çalışmada ki olgular olmak üzere 23 olgudan oluşan bir çalışma daha yayınlamışlardır¹⁵. Bu çalışmada G1-S geçişinde apoptozisi düzenleyen proteinler olan Rb, E2F1, cyclin D1, CDK4,CDK6, p27 kip1, p21, p16, p53, Mdm2, bcl-2 ve Bax ekspresyon düzeyleri sadece immunohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. İmmunohistokimyasal skorlamada Bax ve bcl-2' de sitoplazmik, diğer proteinlerde ise nükleer boyanma dikkate alınmıştır. P16 ve Rb dışında diğer proteinlerin "cut-off" değeri %10 olarak alınmış olup, p16 ve Rb skorlaması için bir önceki çalışma ile aynı kriterler kullanılmıştır. Rb için de p16 proteini gibi heterojen ve negatif boyanma anormal olarak kabul edilmiş olup bu özellik malign tümörlerde daha yaygın olarak saptanmıştır. Bu çalışmada Rb, E2F1, p53, p16 ve p27KIP1'in anormal ekspresyonları malign tümörler ile ilişkili bulunmuştur. Bcl-2, Bax, cyclin D1, CDK-4 ve CDK-6 ekspresyonları istatistiksel olarak tümör davranışı ile ilişkili bulunmamıştır. P53' ün regülasyonunu sağlayan Mdm2 ise GİST' lerde düşük oranda boyanma gösterirken dikkat çekici nokta ekspresyonun malign tümörler ile sınırlı olması ve p53 ekspresyonu ile paralellik göstermesidir. Daha sonra Schneider-Stock ve ark.'nın. 284 olguluk daha



Resim 4: Gastrointestinal Stromal Tümör Yüksek Risk Grubu (H&E x400)

geniş bir serisinde olguların %50 sinde p16 protein ekspresyon kaybını göstermişlerdir (8). Fletcher ve ark.'nın risk kategorizasyonuna göre (5) olguların 28 tanesi çok düşük risk grubu, 55 tanesi düşük risk grubu, 43 tanesi intermediate risk grubu ve 158 tanesi yüksek risk grubuna dahil edilmiştir. Tümörlerin tamamı c-kit ile pozitif boyanma göstermiştir. İmmunohistokimyasal yöntem ile p16 ekspresyonu skoru Sabah ve ark.'nın çalışmasındaki kriterler baz alınarak değerlendirilmiştir^{6,15}. İnternal kontrol olarak non tümöral stromal hücrelerdeki nükleer boyanmalar kullanılmıştır. p16 ekspresyon kaybı 282 olguda gösterilmiş olup bu hastaların 5 yıllık izleminde retrospektif olarak survi %55.7 olarak saptanırken, p16 ekspresyon kaybı olmayan hastalarda survi %76.8 olarak hesaplanmıştır. Bununla birlikte p16 ekspresyon kaybı gözlenen olgularda diğer olgulara oranla 2,3 kat artmış ölüm oranı mevcuttur⁸. Ayrıca nekroz içeren tümörlerde 5,9 kat artmış ölüm oranına sahip olduğunu gösteren bu çalışmanın sonucunda p16 ekspresyon kaybının immunohistokimyasal yöntem ile belirlenmesinin nekroz, metastaz ile birlikte bağımsız ve güvenilir bir parametre olarak kullanılabileceği görülmüştür.

Ricci ve ark. ları 21 olgudan oluşan serilerinde immunohistokimyasal yöntem ile p16 ekspresyon düzeylerini belirlemenin yanısıra RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) ve PCR-MSP (metylation spesifik- polymerase chain reaction) ile bu proteinin genetik düzeydeki değişimlerini incelemişlerdir¹⁶. Bu çalışmada her olgunun histolojik prognostik faktörleri belirlenirken, cerrahi rezeksiyon sınırında tümör içeren olgular çalışmaya alınmamıştır. P16 immunoreaktivitesi değerlendirilirken stromal, epitelial ve inflamatuvar hücreler internal pozitif kontrol olarak kullanılmış, %20 den az nükleer boyanma oranı p16 ekspresyon kaybı olarak tanımlanmıştır. Olguların 11 tanesinde (%52) p16 ekspresyon kaybı gözlenmiş olup bu olguların tamamı malign özellikler (tümör boyutu, koagülatif nekroz varlığı, mitotik oran yüksekliği, selülerite) gösteren grupta yer almaktadır. MSP-PCR yöntemi ile olguların 7 tanesinde p16'nın metillenmiş paterni (promotor metilasyon) saptanmış olup, 6 olgu malign histolojik özellikler gösteren grupta yer almaktadır. p16 promotor metilasyonu p16 "down"regülasyonundan sorumlu bir mekanizmadır¹⁷. Bu sonuçlar göstermiştir ki p16 ekspresyon düzeyi p16'nın genetik değişimleri ile koreleler ancak bu korelasyon tamamını yansıtmamaktadır. Bununla birlikte p16'nın immunohistokimyasal olarak düzeyinin belirlenmesi prognostik bir faktör olarak gelecekte kullanılabilecek umut vadeden bir yöntemdir.

p16INK4 bir "cyclin-dependent kinases" (CDK) 4 inhibitör genidir ve 9p 21'de lokalizedir. p16INK4 bir tümör süpresör geni olarak kabul edilir ve bunun majör biyokimyasal etkisi; G1/S sınırında bekleyen hücreler üzerinde siklus regülasyonudur. Bir tür CDK inhibitör proteini olan p16 CDKN2A (aynı zamanda MTS-1, INK4A olarak da bilinir) gen ürünüdür. Kromozom 9p21'de kodlanır. Tümör süpresör gen olarak kabul edilmekte olup pek çok insan kanserinde p16'nın mutasyon, delesyon veya hipermetilasyon yoluyla inaktivasyonu yaygın olarak görülmektedir. P16 içerisinde p15, p18 ve p19 proteinlerini de bulunduran INK4A protein ailesinin üyesidir. Hücre strese girdiğinde p16 proteini üretilir. P16 Rb sinyal yo-

lağının önemli bir üyesidir¹⁸. Hücre siklus progresyonunu inhibe eder. Bunu CDK4 ve CDK6'ya bağlanarak ve aktif siklin D1-CDK kompleksinin oluşumunu engelleyerek yapar. Dolaylı olarak Rb fosforilasyonunu inhibe eder böylece Rb'ü aktive ederek E2F'e bağlanmasını sağlar ve progresyonu engellemiş olur¹⁹⁻²¹. Bazı tümörlerde p 16 inaktivasyonu homozigot delesyon, nokta mutasyonları veya bu genin ilerletici bölgesinin de novo metilasyonu ile olabilir¹⁹⁻²¹. P16INK4 fonksiyon kaybı düzensiz hücre proliferasyonu ve kanser progresyonuna neden olur. Bu nedenle p16 ekspresyon kaybının yukarıda bahsi geçen çalışmaların da gösterdiği gibi kötü prognoza ilişkili olması akla yatkın gözükmektedir.

Ancak son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda bizim çalışmamıza benzer şekilde GİST'lerde p16 kaybından ziyade ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu farklı sonuçlar onkogeneze tek yolun p16 kaybının olmadığı, bununla birlikte hücre siklus regülasyonunu bozan başka mekanizmaların (cyclin D overekspresyonu -Rb kaybı gibi) da var olabileceğini düşündürmeye başlamıştır.

Steigen ve ark.'nın 2008 yılında yayınlanan 434 olguluk çalışmasında p16 ekspresyonunun yüksek mitotik aktiviteye sahip malign GİST'lerde daha yaygın olduğu saptanmıştır⁷. Bu çalışmada p16 ve L1 protein ekspresyon düzeyleri immunohistokimyasal yöntem ile değerlendirilmiş, tümörler Fletcher ve ark.'nın belirlediği mitoz ve tümör çapından oluşan risk kategorizasyonuna göre gruplandırılmıştır. Mitoz ardışık olarak 50 büyük büyütme alanında sayılmıştır. Ayrıca prognostik faktörler olarak düşünülen hücre tipi, atipi, nekroz, ülserasyon, mukozal invazyon ve hemoraji bulguları da her olgu için kaydedilmiştir. İmmunohistokimyasal sonuçlar negatif; zayıf pozitif boyanma (%10 un altında boyanma); orta derecede pozitif boyanma (%10-50 arası) ve kuvvetli pozitif boyanma (%50 den fazla) olarak değerlendirilmiş; negatif ve zayıf boyanma negatif; orta ve kuvvetli boyanma ise pozitif olarak kategorize edilmiştir. Olguların 180 tanesi (%42) p16 ile pozitif boyanma göstermiş olup bu olgularda negatif boyanma gösterenlere göre anlamlı survey

azalması saptanmıştır. Bu negatif prognostik anlam özellikle mide ve ince barsak lokalizasyonlu tümörlerde dikkat çekicidir. Gastrik yerleşimli tümörler açısından bakıldığında p16 ekspresyonu gösteren tümörlerdeki ortalama survey 3,8 yıl iken p16 ekspresyonu göstermeyen tümörlerde bu oran ortalama 6,5 yıl olarak saptanmıştır. İnce barsak yerleşimli olgularda ise p16 pozitif tümörlerdeki survey 3.2 yıl iken negatif tümörlerde 5,2 yıldır. Bizim çalışmamızda p16 ekspresyonu ile tümör lokalizasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamış olsa da, klinik takibi olan hasta sayımız az olduğu için survi açısından yorum yapmak mümkün olmamıştır. Ayrıca bu çalışmada invaziv kolon kanserlerinde ekspresyonu artan ve overekspresyonu metastatik malign melanom ile ilişkili olduğu düşünülen L1 proteininin GİST'lerde survi ile ilişkisi gösterilememiştir.

Schmieder ve ark.'nın 101 hastadan oluşan çalışmalarında ise yine yüksek riskli gruptaki olgularda, p16 ekspresyonunun daha fazla görüldüğü bildirilmiştir²². Bu çalışmada da olgular Fletcher ve ark.'nin risk kategorizasyonuna göre gruplandırılmış sellüerite, hücre tipi gibi prognostik parametreleri kaydedilmiştir. Mitoz en selüler ve mitotik aktif olan 50 büyük büyütme alanında sayılmıştır. Hastalısız sağ kalım ve sağ kalımlar ile p16 ekspresyon düzeylerini karşılaştırmışlardır. Olguların tamamında immunohistokimyasal yöntem ile p16 ekspresyonu incelenmiştir. "Cut-off" değeri 10 büyük büyütme alanında %10, %20 ve %50 oranında nükleer boyanma alınarak prognostik analiz çalışmaları yapılmıştır. Tüm popülasyondaki oranlara bakıldığında p16 ekspresyon düzeyleri ile sağ kalımlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Ancak yalnızca yüksek risk grubundaki olguların p16 ekspresyon düzeyleri ele alındığında p16 ekspresyon düzeyleri tümöre bağlı ölümler, hastalısız / hastalıklı sağ kalım oranları ve metastaz / rekkürrens ile istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar göstermektedir. Bu da p16 ekspresyonunun yüksek riskli gruptaki olgularda daha anlamlı bir prognostik marker olduğunu; metastaz, rekürrens ya da hastalığa bağlı ölüm oranı açısından

çok yüksek riske sahip olguları belirlemede kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ancak farklı metodlar, farklı "cutoff" değerleri, farklı izlem süreleri ve araştırma değişkenleri nedeniyle p16 ekspresyonunun prognostik değerini belirlemek zor olabilmektedir. Aslında bizim çalışmamızda da p16 kuvvetli ekspresyonu (%50'den fazla) sadece yüksek risk grubunda saptanmıştır. Diğer risk grubundaki olguların hiçbirinde kuvvetli ekspresyon izlenmemiş olup bu bulgu; p16 ekspresyonunun yüksek risk grubunda daha anlamlı bir prognostik parametre olabileceğini desteklemektedir. Ancak klinik takipli hasta sayımız az olduğundan prognoz üzerine yorum yapmak mümkün olmamıştır.

p16 onkogeneizde etkili olan tek tümör supressör protein değildir. p16'dan gelen sinyaller ile hücre döngüsünün durdurulması (cell cycle arrest) için Rb'un ekspresyonu esastır, çünkü Rb'nin yokluğunda p16'nın aşırı şekilde üretilmesi hücre döngüsünün durdurulmasına neden olmaz. Sonuç olarak, p16 ekspresyonu görülen tümörlerde p16-cyclinD-CDK4-Rb yolağındaki farklı değişimler görülmektedir (Rb ekspresyonunun kaybı veya CDK4'ün veya siklin D1'in aşırı ekspresyonu gibi)²³. Rb ile p16 arasında negatif bir "feedback" halkası vardır. p16 transkripsiyonu Rb tarafından baskılanmaktadır. Dolayısıyla, Rb'nin inaktif olduğu hücrelerde p16 miktarının oldukça yüksek bulunması şaşırtıcı değildir. Ancak bu hücrelerde p16 hücre döngüsünün durdurulmasında etkili değildir²³.

Bütün bu bilgiler ışığında p16 ekspresyonunun immunohistokimyasal yöntemle saptanan "over ekspresyonu" tümör supressör görevini devam ettirdiği anlamına gelmez. Aksine tümör supresyonunda blokaj olması p16 düzeyinin yüksek olmasına neden olabilir. Bu nedenle p16 ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak belirlenmesi beraberinde genetik düzeyde yapılabilecek gen ekspresyon çalışmalarına da ihtiyaç duyulmaktadır.

p16 ekspresyonu ile tümör çapı arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Tümör çapı Fletcher ve ark.'nin⁵ risk kategorizasyonundaki temel kriterlerden biridir. Ve risk artışı ile tümör çapı artışı

arasında pozitif bir korelasyon vardır. Yüksek risk grubundaki olgularda (Resim 4) tümör çapı daha büyük olması nedeniyle bu bulgu çok şaşırtıcı değildir. Aynı şekilde bu risk kategorizasyonundaki diğer önemli kriter olan mitoz sayısı ile p16 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki mevcuttur ki bu da şaşırtıcı değildir.

KAYNAKLAR

- 1) Sturgeon C, Cheifec G, Espat NJ. Gastrointestinal stromal tumors: a spectrum of disease. *Surgical Oncology* 2003; 12: 21-26.
- 2) Park S, Kim M, Kim H, Song BJ, Chi JG: Ultrastructural Studies of Gastrointestinal Stromal Tumors. *J Korean Med Sci* 2004; 19:234-44.
- 3) Strickland L, Letson GD, Muro-Cacho CA. Gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Control* 2001;8(3): 252-261.
- 4) Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC: Biology of Gastrointestinal Stromal Tumors. *JCO* 2004; 22:3813-3825
- 5) Fletcher C, Berman J, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Miettinen M, Rubin B, Weiss S. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* 2002;33:459-465.
- 6) Sabah M, Cummins R, Leader M, Kay E. Loss of heterozygosity of chromosome 9p and loss of p16INK4A expression are associated with malignant gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol*. 2004;17:1364-1371.
- 7) Steigen SE, Bjerkehagen B, Haugland HK, Nordrum IS, Loberg EM, Isaksen V, Eide TJ, Nielsen TO. Diagnostic and prognostic markers for gastrointestinal stromal tumors in Norway. *Mod Pathol*. 2008;21:46-53.
- 8) Schneider-Stock R, Boltze C, Lasota J, Peters B, Corless CL, Ruummele P, Terracciano L, Pross M, Insubato L, Di Vizio D, et al. Loss of p16 protein defines high-risk patients with gastrointestinal stromal tumors: a tissue microarray study. *Clin Cancer Res*. 2005;11:638-645.
- 9) Duffaud F, Blay JY. Gastrointestinal stromal tumors: biology and treatment. *Oncology* 2003; 65: 187-197.
- 10) Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors-definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch* 2001; 438: 1-12.
- 11) Deitos AP. The reappraisal of gastrointestinal stromal tumors: from stout to the KIT revolution. *Virchows Arch* 2003; 442: 421-428.
- 12) Karin Milde-Langosch, Ana-Maria Bamberger, Gabriele Rieck, Bianca Kelp and Thomas Löning. Overexpression of the p16 Cell Cycle Inhibitor in Breast Cancer is Associated with a More Malignant Phenotype. *Breast Cancer Research and Treatment*; Volume 67, May, 2001:61-70.
- 13) Nielsen GP, Stemmer-Rachamimov AO, Shaw J. Immunohistochemical survey of p16INK4A expression in normal human adult and infant tissues 1999; 79(9): 1137-1143.
- 14) Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, et al. Frequency of homozygous deletion at p16 in primary human tumours. *Nature Genet*. 1995; 11: 210-212.
- 15) Sabah M, Cummins R, Leader M, Kay E. Altered expression of cell cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumors: markers with potential prognostic implications. *Hum Pathol*. 2006;37:648-655.
- 16) Ricci R, Arena V, Castri F, Martini M, Maggiano N, Murazio M, Pacelli F, Potenza AE, Vecchio FM, Larocca LM. Role of p16/INK4a in gastrointestinal stromal tumor progression. *Am J Clin Pathol*. 2004;122:35-43.
- 17) Schneider-Stock R, Boltze C, Lasota J, Miettinen M, Peters B, Pross M, Roessner A, Gunther T. High prognostic value of p16INK4 alterations in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol*. 2003;21:1688-1697.
- 18) Sohn J, Kristjónsdóttir K, Sofi A. Remote hot spots mediate protein substrate recognition for the Cdc25 phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 2004; 101(47):1637-41.
- 19) Khleif SN, Degregori J, Yee CL. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Cell Biology* 1996; 93: 4350-54.
- 20) Vernell V, Helin K, Müller H. Identification of target genes of the p14INK4A-Prb-e2f PATHWAY. *J Biol Chem* 2003; 278(46): 46124-46137.
- 21) *Cancer In: Alberts B, Jhonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, editors. Molecular biology of the cell. 4th ed. New York: Taylor and Francis Group; 2002.p. 1313-1362.*
- 22) Schmieder M, Wolf S, Danner B, Stoehr S, Juchems M S., Wuerl P, Henne-Bruns D, Knippschild U, Hasel C and Kramer K. p16 expression differentiates high-risk gastrointestinal stromal tumor and predicts poor outcome; neoplasia, october 2008:1154-1162.
- 23) The INK4A/ARF locus: Role in cell cycle control and apoptosis and implications for glioma growth. Stacey M. Ivanchuk, Soma Mondal, Peter B. Dirks and James T. Rutka *Journal of NeuroOncology* 51: 219-229, 2001. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.