

T. C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
ANKARA HASTANESİ
PATOLOJİ LABORATUVARI
ŞEF : DR. İNCİ KÖSELİ

**SAFRA KESESİ ADENOKARSİNOMLARINDA
CARCINOEMBRYONIC ANTİGEN ve
HUMAN CHORIONIC GONADOTROPİN
VARLIĞININ İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. ŞÜKRÜ O. ÖZDAMAR

ANKARA — 1990

Uzmanlık eğitimim süresince, bilimsel katkıları ile çalışmalarımın yönlendirilmesinde ve tez konumun seçilmesinde yakın ilgi ve desteklerini gördüğüm, değerli hocam Dr. İnci Köseli'ye,

Tez konumun seçilmesinde ve gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen, sayın Prof.Dr. Şevket Ruacan'a

İmmünopatoloji konusundaki çalışmalarımı bünyelerinde gerçekleştirdiğim, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na

Asistan arkadaşlarıma ve Laboratuvarlar personeline, teşekkür ederim.

Dr. Şükrü O. ÖZDAMAR

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|------------------------|--------------|
| GİRİŞ ve AMAÇ..... | 1 |
| GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| MATERYAL ve METOD..... | 36 |
| BULGULAR..... | 41 |
| TARTIŞMA..... | 57 |
| SONUÇLAR..... | 67 |
| ÖZET..... | 70 |
| SUMMARY..... | 71 |
| KAYNAKLAR..... | 72 |

GİRİŞ ve AMAÇ

İlk kez 1965 yılında Gold ve Freedman'ın tanımladığı "Carcinoembryonic Antigen" (CEA)'in, endoderm kökenli intestinal adenokarsinomlardan kaynaklanan bir kanser spesifik antijen olduğu ileri sürülmüştür (1,27,70). Çeşitli yazarlar tarafından normal dokular yanı sıra, meme, testis, tiroid, bronş ve tükrük bezi tümörlerinde de varlığı bildirilmiştir (1,8,19,25,48). 1962 yılında Midgley ve Pierce tarafından tanımlanan "Human Chorionic Gonadotropin" (HCG) ise normalde plasenta sinsityotrofoblastlarında sentezlenen bir glikoprotein hormondur. Normal gastrointestinal sistem mukozası gibi çeşitli normal dokular yanı sıra, mide, karaciğer, kolon ve pankreas tümörlerinde, bronkojenik karsinomada, melanoma ve meme kanserinde de ektopik yapımı belirlenmiştir (15,25,47,52,90).

Gastrointestinal sistem malign tümörlerinin yaklaşık % 3 ünü oluşturan safra kesesi kanserlerinin % 80 ile % 90'ı adenokarsinomlardır (4,12,17,51). En sık 55-60 yaşlar arasında ortaya çıkan bu tümörlere kadınlarda daha sık rastlanır (17,42,61,81). Mikroskopik görünümleri gastrointestinal traktusun herhangi bir yerinde görülebilecek bir adenokarsinoma ile benzerdir (3,51,65,68).

Safra kesesinin de endoderm kökenli olması nedeni ile gastrointestinal sistemdeki birçok maddenin safra kesesinde de bulunabileceği varsayılır (3,7,28,31,46). Buna rağmen yukarıda belirtilen markerler, gerek normal gerekse karsinomatöz safra kesesi dokularında çok az araştırılmış; özellikle Human Chorionic Gonadotropin varlığına yönelik bir çalışma bizim ilgilendiğimiz tümör grubunda hiç yapılmamıştır.

Çalışmamızın amacı safra kesesi adenokarsinomlarında tümör grade'i ile bu markerlerin varolma ve dağılım patternleri arasındaki ilişkiyi incelemek ve özellikle Human Chorionic Gonadotropin konusunda genel literatüre bir katkıda bulunabilmektir.

GENEL BİLGİLER

İzolog konaklardan gelen tümörlere karşı immünize edilmiş hayvanların tümörleri reddettiğinin, ancak aynı konaklardan gelen deri greftlerini reddetmediğinin gösterilmesi, tümör hücrelerinin normal hücrelerinkinden farklı spesifik antijenlere sahip olduğunu ve bunların söz konusu olan konakta, immun bir yanıt geliştirebildiğini ortaya koymuştur (17,43,51,70,75). Ayrıca dediferansiye neoplastik hücrelerde normalde yalnız embriyonik hücrelerde bulunan maddeleri meydana getirebilme özelliği de bulunabilir. Bu karsinoembriyonik veya onkofetal maddelerin varlığı heterolog konaklarda gösterilmiş olduğu için tümörle ilişkili antijenler adı verilmiştir. Bununla beraber bu maddeler otolog konakta antijen gibi davranmazlar (17,49,70,75).

Tümör belirleyicileri (marker), hücre ve doku homojenatları, kan, idrar, beyin-omurilik sıvısı, gastrointestinal salgılarda; biyokimyasal ve radioimmünoassay yöntemlerle değerlendirilmekte, belirleyicilerin kantitatif değerleri duyarlılıkla elde edilebilmektedir (17,26,43,75). Sağlıklı kişiler ile tümörlü oğuların değerlerinin belirlenmesi sayesinde bu yöntemlerle risk grupları ve şüpheli olgular taranmakta, tümörlerin histogenezisi,

diferansiyasyonu, erken ve ayırıcı tanısı ile biyolojik davranışı araştırılmakta; tedavi sonrası, hastaların rekürrens ve metastazlar yönünden değerlendirilmesi yapılabilmektedir (17,61,70,75).

Tümör belirleyicilerinin serum düzeyleri tümör dokusu yapım hızına bağlı olduğu kadar; tümör hücrelerinden salınımına, total dolaşımdaki seyrelmeye, tümör evresine, tümör hacmine ve markerin ekskresyonuna da bağlıdır (26,43,75).

Çeşitli immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak dokularda gösterilebilen tümör belirleyicileri hücrede sitoplazma, sitoplazmik membran ve nükleusda yer alabilmektedir. Ancak bunların hücre ve dokularda dağılımı diffüz ve homojen değildir. Değerlendirmelerde bu özellik dikkate alınır. Serumda veya vücut sıvılarında tümör belirleyicilerini saptayan antikör dokuda aynı belirleyici saptama yeteneği göstermeyebilir. Bu özellik daha çok monoklonal antikörlerde görülür (17,26,43,70,75).

Dokuda tümör belirleyicisi değerlendirmede kullanılan yöntemin duyarlı, antiserumun spesifik, incelenen dokunun canlı veya uygun tespit edilmiş olması, antijenin yeterli düzeyde olması ve tespit işlemlerinden etkilenmesi büyük önem taşır. Dokuda az miktarda bulunan ve labil olan antijenler ancak frozen kesitlerde gösterilebilir (61,70,75).

Bazı Tümör Belirleyicileri (17):

Belirleyiciler

İlişkili Oldukları Tümörler

Hormonlar

- | | |
|----------------------------------|--|
| - Human chorionic gonadotropin | - Trofoblastik tümörler, non seminomatöz testiküler tümörler |
| - Calcitonin | - Tiroid medüller karsinomu |
| - Catecholamine ve metabolitleri | - Pheochromocytoma ve ilişkili tümörler |
| - Ektopik hormonlar | - Paraneoplastik sendromlara neden olan bütün tümörler |

Onkofetal Antijenler

- | | |
|----------------------------|--|
| - Alpha-fetoprotein | - Karaciğer kanseri, testisin non seminomatöz germ hücreli tümörleri |
| - Carcinoembryonic antigen | - Kolon, pankreas, akciğer, mide ve meme kanseri |

İzoenzimler

- | | |
|------------------------------|--|
| - Prostatic acid phosphatase | - Prostat kanseri |
| - Neuron-specific enolase | - Akciğer küçük hücreli kanseri, nöroblastom |

Spesifik Proteinler

- | | |
|-----------------------------|---|
| - İmmünglobulinler | - Multipl myeloma ve diğer gammopatiler |
| - Prostate-Spesific antigen | - Prostat kanseri |

Musinler ve Diğer Glikoproteinler

- | | |
|-----------|-----------------------------|
| - CA 125 | - Over kanseri |
| - CA 19-9 | - Kolon ve pankreas kanseri |
| - CA 15-3 | - Meme kanseri |

Patolojide tanı yöntemi olarak kullanılan temel histolojik teknikler XIX. yüzyılın başından bu yana değişmemiştir. Ancak son 40-50 yıl içinde immünohistolojik teknikler geliştirilmiş ve patoloğlara önemli yararları olmuştur.

İmmünohistokimya insitu olarak bir dokuda oluşturulan spesifik antijen-antikor reaksiyonunu görünür hale getirmek esasına dayanır. Bunun için dokuda mevcut antijenin iyi korunması ve uygun antikorum bulunması gerekir (18,21,36,70,72). Coons ve arkadaşlarının 1941 yılında bildirdikleri immünofluoresan-işaretli antikor tekniği; immün kompleks veya otoantikor depolanması ile karakterize hastalıkların incelenmesine yeni bir boyut kazandırmıştır (58,60,70,75). Ancak fluoresans'ın hızla kaybolması, bunun sonucu olarak preparat incelenmesinde karşılaşılan süre kısıtlılığı ve preparatların uzun süre saklanamaması; sadece frozen kesitlerde veya uygun transport ortamlarında nakledilmesi gereken dokularda çalışılması zorunluluğu, önceden rutin takip işlemi uygulanmış vakalarda retrospektif çalışmaya imkan vermemesi, ışık mikroskopik bulgularla immünofluoresans bulgularının iyi

korele edilememesi ve özel mikroskopik ekipman gerektirmesi zaman içinde bu metodun önemini yitirmesine neden olmuştur (60,70,75).

1960'ların sonlarında ve 1970'lerin başlarında bu problemler Nakane ve Pierce tarafından enzim işaretli antikörlerin geliştirilmeleri ile büyük ölçüde giderildi (60,70). Di Stefano ve arkadaşları ile Taylor ve Burns bu metodları formalin fikse, parafine gömülü dokulara uyguladılar. Sternberger'in Peroksidaz-anti-peroksidaz metodu ile Hsu ve Raine'in avidin-biotin-peroksidaz kompleksi metodu gibi çok duyarlı immünoenzim boyama metodlarının geliştirilmesi, 1975 yılında Kohler ve Milstein tarafından hybridoma teknolojisi ile saf ve spesifik antikörlerin üretilmeye başlanması; immunohistokimyasal tekniklerin diagnostik cerrahi patoloji laboratuvarlarına girmesine yol açmıştır (11,18,21,36,58-60,70,72,75).

METODLAR

1. Direkt Metod : İşaretli primer antikör direkt olarak doku preparasyonuna uygulanır.
2. İndirekt Metod: Primer antikör işaretsizdir. Primer antikora spesifik bağlanabilen bir sekonder antikör ile idantifiye edilir. Her bir primer antikör molekülüne en az iki sekonder antikör bağlanabilir. Bu metod direkt metoda oranla daha duyarlıdır.

3. İşaretsiz Antikor-Enzim Metodları: Primer antikor ile enzim-anti-enzim kompleksi veya avidin-biotin-enzim kompleksi arasında nonkonjüge köprüleşen sekonder antikor kullanılır.

A. Peroksidaz-Anti-peroksidaz: Sternberger peroksidaz molekülünü anti-peroksidazla birleştirmiş 2 antikor molekülü ile 3 peroksidaz molekülünü stabil, siklik bir kompleks oluşturabilir hale getirmiştir.

Birinci basamak tavşan anti-doku antijenidir. İkinci basamak her biri iki benzer bağlanma bölgesi olan (Fab kısmı) nonkonjüge (keçi) anti-tavşan IgG ve üçüncü basamak tavşan PAP kompleksidir. Burada tavşan PAP molekülleri çok miktarda primer antijen işaretleyebilmektedir. Son basamakta spesifik bağlanma ve oldukça temiz ve duyarlı bir metod olması nedeni ile tüm indirekt metodlar arasında en iyisi olmamakla beraber en popüler olan ve kullanılanlarından biridir (58,60,70,72). İmmunofluoresans metodlara göre 100 ile 1000 kat daha duyarlıdır (71).

B. Alkaline Phosphatase-Anti-alkaline Phosphatase: Bu metod PAP metodu ile aynı esasa dayanır. Aynı şekilde çok duyarlıdır. Bu gün için sadece monoklonal fare anti-alkaline phosphatase üretilebildiği için APAAP metodu sadece monoklonal fare primer antikorları ile kullanılarak uygulanabilmektedir (70,72).

AVIDİN - BIOTİN METODLARI

Bu metod biyokimyacıların öteden beri bildikleri ve kullandıkları avidin ile biotin arasındaki yüksek affiniteden yararlanır (70). Bu ilişki yaklaşık 40 yıl önce keşfedilmiştir (38,70). Bu sistemin immunohistokimya alanında uygulanması 1977 yılında Heggeness ve Ash tarafından ilk kez floresans mikroskopunda yapılmış, 1979 da Guesdon ve arkadaşları direkt ve köprü tekniklerini tanımlamışlar, 1980 de ise Warnke ve Levy bu metodu monoklonal antikörlerle çalışılabilir hale getirmişlerdir (70). Son olarak 1981 de Hsu ve arkadaşları bu tekniği geliştirerek avidin-biotin kompleksi metodunu geniş kullanım alanlarına uygulanabilir hale getirmişlerdir (38,70).

Metodun Temel Esasları (38,70):

Bütün avidin-biotin metodları 4 ana esasa dayanır:

1- Avidin ile biotin molekülleri arasında olağanüstü affinite vardır ve herhangi bir kalıcı kompleks ile köprüleşebilirler.

2- Biotin'in tek bir reaksiyonla enzim veya antikörler gibi daha büyük bir moleküle kaplanabilmesi mümkündür.

3- Avidin'in enzimler, ağır metaller ve fluorochrome'lar gibi çeşitli belirleyicilerle işaretlenmesi mümkündür.

4- Avidin antikor ve preroksidaz gibi biotin ile işaretlenmiş iki ayrı molekülle köprüleşebilir.

Avidin, 67 000 D ağırlığında, yumurta akında büyük miktarlarda bulunan herbiri 128 amino asit içeren 4 polipeptid zincirinden meydana gelmiş subunitlere sahip basit bir glikoprotein molekülüdür. En önemli özelliği tersiyer yapısından kaynaklanır; her bir subunit, üzerinde hidrofobik paketler içerir ve biotine bağlanma da bu alanlar üzerinden olur (37,38,70).

Streptavidin:

Avidin yüksek bir izoelektrik noktaya (10.5) sahiptir ve oligosakkarit kalıntıları içerir. Bu minör dezavantajları avidin yerine streptavidin adı verilen ve Streptomyces avidinii kültürlerinden elde edilen 60 000 D ağırlığında avidine benzer 4 subuniti olan bir molekülün kullanılmaya başlanmasına neden olmuştur. Bu molekülün oligosakkarit kalıntıları yoktur ve nötral izoelektrik noktaya sahiptir, dolayısıyla avidin gibi nonspesifik bağlanma özelliği yoktur. Ancak pratik kullanımda aralarında hiçbir fark gözlemlenmez (70).

Biotin ise suda eriyen bir vitamindir (vitamin H); 244 D ağırlığında küçük bir moleküldür. Yumurta sarısında, hayvan ve bitkilerde bolca bulunur (38,70). Karboksil grupları nedeniyle farklı proteinlere bağlanabilir.

Avidin-Biotin Reaksiyonu:

Bu reaksiyon non kovalent bağlarla olur; oldukça hızlıdır ve doğada bilinen en kuvvetli bağlanmalardan biridir (38,70). Bu iki molekül ancak pH: 1,5 gibi çok ekstrem koşullarda birbirinden ayrılabilir.

Biotin ile Bağlanma:

Biotin molekülünün küçüklüğü nedeniyle bir antikor molekülüne en az 150 tane biotin bağlanabilir (70).

Avidin'in İşaretlenmesi:

Avidin, rhodamin veya fluorescein gibi bir fluorochrome ile, peroxidase phosphatase, β -galactosidase gibi bir enzimle, ferritin ile veya altın partikülleri ile işaretlenebilir (60,70).

Avidin-biotin metodlarında biotin ile bağlanmış antikorun primer veya sekonder olmasına göre 3 farklı yöntem uygulanabilir (Şekil 1):

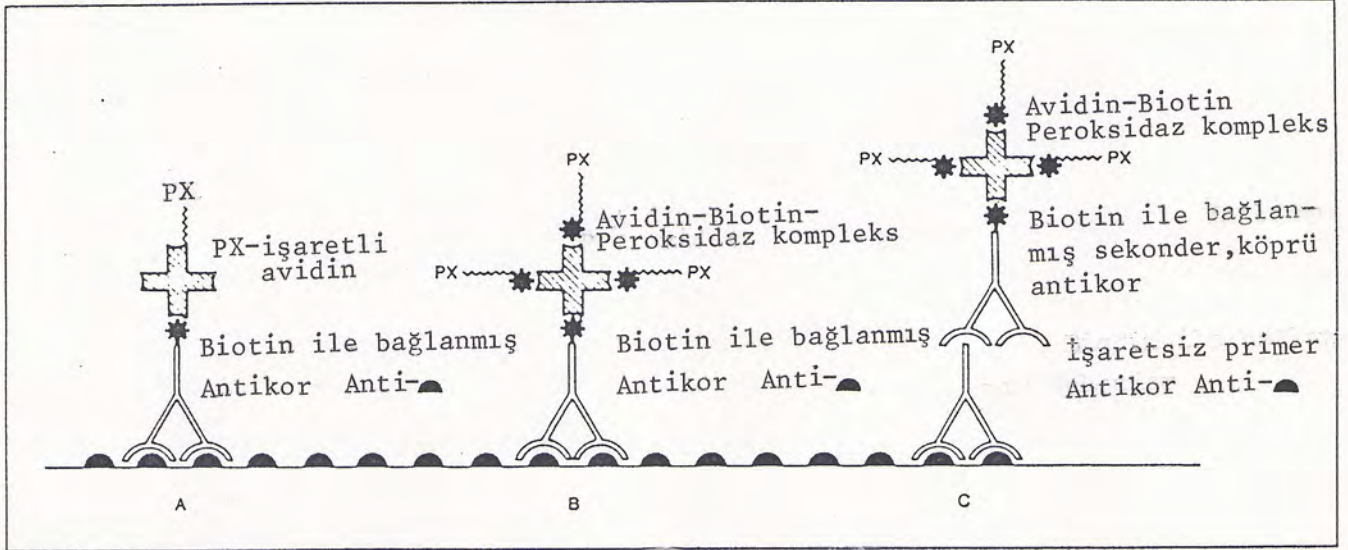
a- İşaretli avidin: Günümüzde eski önemini yitirmiş olmalarına rağmen önceki yıllarda avidin-biotin immünohistokimyasında direkt metodlar kullanılmıştır.

b- Köprü Avidin: İmmünoenzimatik prosedürlerde avidin'in köprü olarak kullanılması sınırlıdır.

İndirekt ve Direkt köprü avidin-biotin metodları pratik olmamaları nedeniyle tercih edilmemektedirler.

c- Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi (ABC): Bu metod en popüler metodlardan biridir ve en hassas olanıdır. Genellikle indirekt olarak kullanılır.

Avidin molekülü üzerindeki 4 reaksiyon alanından en az bir tanesinin antikor molekülü üzerindeki biotinle bağlanabileceği bir avidin-biotin-peroksidaz kompleksi hazırlanmak zorundadır. Daha sonra buna biotin ile bağlı antikor eklenecektir (18,21,36-38,58-60,70).



Şekil 1: İmmünoenzimatik Biotin-Avidin teknikleri (21)

- | | |
|----------------|---------------------------------------|
| ▲ : Antijen | A- İşaretili Avidin |
| Px: Peroksidaz | B- Köprü Avidin |
| ★ : Biotin | C- Avidin-biotin-peroksidaz kompleksi |
| + : Avidin | |

Diğer teknikler: Son yıllarda avidine veya biotine karşı geliştirilen antikörlerin ve biotin ile bağlı protein A'nın kullanıldığı metodlar bildirilmektedir (70).

Avidin-Biotin Metodlarının Avantajları

1- Duyarlılık: Bir antikör molekülünün en az 150 biotin molekülü ile kaplanabilmesi ve her birinin bir işaretli avidin veya avidin-biotin -peroksidaz molekülü ile bağlanabilme özelliği oldukça basit ama oldukça yüksek bir marker/antijen oranı sağlayan bir metod olmasını doğurur. Ayrıca avidin ve biotin üzerine bağlanabilen çok sayıda peroksidaz nedeniyle de duyarlılığın artmasına neden olur (37,38,70).

2- Kullanışlılık: Avidin-biotin metodları araştırma ve diagnostik laboratuvarlarında çok çeşitli doku, antijen ve antikörler ile kullanılabilir. Metod üzerinde yapılabilecek ufak teknik değişiklikler ile elektron mikroskopide de başarıyla uygulanabilir (60,70).

Avidin-Biotin Metodlarının Dezavantajları

1- Endojen Biotin: Karaciğer, meme, yağ dokusu ve böbrek gibi çeşitli normal insan dokularında doğal olarak bulunan endojen biotin avidin ile bağlanarak yanlış-pozitif reaksiyonlara neden olabilir. Bu dezavantaj işaretli avidin ve köprü avidin metodlarında görülür, avidin-biotin-peroksidaz kompleksi metodunda görülmez (70).

2- Mast hücre boyanması: Mast hücre granülleri fluorokromlar veya enzimlerle işaretli avidin ile veya ABC ile bağlanır. Ancak bu artefakt tolere edilebilir düzeydedir. Yine de streptavidin kullanılarak veya reaksiyonun PH değerini 9.4 üzerine çıkararak bu bağlanmanın önüne geçilebilir (70).

Doku ve Antijenin Korunması: Yapının korunması ve rutin histolojik boyanma prosedürleri sırasında doku komponentlerinin bozulmaması için taze dokuya uygulanan formaldehid veya glutraldehid gibi klasik kimyasal fiksatifler bazen antijenik bölgelerde, proteinlerde çapraz bağlanma reaksiyonu oluşturarak, kapanmaya neden olabilirler. Bu yüzden immünohistokimya prosedürleri uygulanacak dokuda çalışılacak her bir antijen için farklı fiksasyon metodları ve ajanları uygulanması zorunluluğu vardır. Bu ajanlardan bazıları; tamponlu nötral formalin, tamponlu p-benzoquinone, formaldehid buharı, diethyl pyrocarbonate, formol saline, Bouin solusyonu, periodate-Lysine-parafomaldehid, B₅ dir. Bununla beraber klasik formalin fiksasyonu parafine gömülü doku kesitlerinde yeterli sayılabilecek oranda başarılı olmaktadır (60,70). Huang ve arkadaşları ileri sürdükleri "proteaz digestion" yöntemi ile ileri derecede fikse olmuş antijenik bölgelerin açığa çıkarılabilmesini sağlamışlardır. Bunun için kullanılan ajanlar trypsin, proteinaz, proteaz, pronaz, pepsin ve ficin'dir (32,55,60). Formalinde fikse edilmiş dokulara

uygulandığında bu yöntemle immün boyanmanın yoğunluğunun arttığı bildirilmiştir (55,60,70).

Immünperoksidaz prosedürlerinin çoğunda sonraki basamak endojen peroksidazın bloke edilmesidir. Bunun için kullanılan ajanların en iyileri; distile suda % 3 H_2O_2 , metanolde % 0,3 H_2O_2 veya % 0,1 Sodyum azide'de % 0,3 H_2O_2 dir (58,60,70). Bunlardan herhangi biri ile nötrofil polimorfonükleer lökositlerdeki lizozimler içindeki endojen peroksidazlar ile eritrositlerdeki pseudoperoksidazlar bloke olurlar ve nonspesifik boyanma olasılığı azaltılmış olur (60,70).

Antijenin saptanmasında primer antisera'nın spesifik bağlanması da çok önemlidir. Seçilen antikor bütün tümör ve doku tiplerinde sabit bir dilüsyonda maksimal boyanma göstermez (60). Primer antikoru test için önce değişik dilüsyonlar hazırlanır ve inkübasyon süreleri ve sıcaklığı diğer basamaklar sabit tutularak değiştirilir ve reaksiyonlar başlatılır (38,58,60,70). Genellikle formalin fikse parafine gömülü doku örneklerinde kit halindeki antikorlar yerine konsantre formların tercih edilmesi, ideal antikor dilüsyonunun her laboratuvar tarafından bizzat test edilerek saptanmasının, optimal boyanmanın ön koşullarından biri olduğu, ileri sürülmektedir (58,60).

Primer antiserada en yüksek dilüsyonu kullanmak pozitif boyanmayı sağlar. Antijen ve antikor kombinasyonunun

oranı bir birleşme sabitine bağlıdır. Yüksek afiniteli antikorlar için bu değer 10^7 ile $10^{12} M^{-1}$ dir. Ayrıca immün boyanmanın gerçekleşebilmesi için düşük olması gereken bir de "dissosiasyon sabiti" (K-1) vardır (70). Her iki sabit değer de; antikor dilüsyonuna, inkübasyon süresine ve sıcaklığına bağlı olarak değişir (58,60,70). Bir antikorun değeri afinitesine ve etkisine bağlıdır. Benzer şekilde, antijenin polimerik bir dizi tek tek epitoplara varsa, tek bir epitopu olanlara oranla antikorlara yüksek afinite gösterir (60,70).

Avidin-biotin metodlarından birinde kullanılacak sekonder antikor, biotin ile işaretlenmiş olmalı ve tavşan, keçi, fare, kobay veya sıçan gibi kaynaklardan elde edilmiş primer monoklonal antikorlar ile immünolojik reaksiyona girebilecek nitelikte polivalan olmalıdır (36, 58,60,70).

İmmün reaksiyon, chromogen adı verilen maddelerin reaksiyona katılmaları ile görünür hale gelir (60,70). Bunlardan en popüler olanları; 3,3-diaminobenzidine (DAB), 3-amino-9 ethylcarbazole (AEC) ve 4-chloro-1-naphthol (CN) dur (58,60,70). Bunlardan DAB, karsinojenik olduğu yolunda iddialara rağmen, polimerlerinin organik çözücülerde çözünmemesi ve stabil olması ve preparasyonların; sentetik mounting mediumlarla kapatılabilmesi, depolanabilmesi ve saklanabilmesine olanak tanınması nedeniyle, kullanılması

en çok önerilen peroksidaz işaretleyici ajandır. Dokudaki son ürünleri kahverengi görünüm verir (60,70). DAB ye alternatif olarak en sık AEC kullanılır. Bu ajan dokuda kırmızı, benzer niteliklere sahip olan CN ise mavi renk oluşturur. Bunlar organik çözücülerde çözünürler; bu yüzden su içeren kapaticılarla kapatılabilen preparatlarda bir süre sonra boyanma yoğunluğu azalır ve kaybolur, preparatlar depolanamaz (60,70).

Zıt boyamada en sık kullanılan ajan hematoksilendir. Hücre yüzey veya sitoplazmik markerlerinde iyi sonuç verir (60).

Son olarak yapılan işlem dehidratasyon ve montaj, rutin tekniklerde olduğu gibi uygulanır (58,60).

Nadji ve Morales'e göre immün boyanmada, gerçek pozitif reaksiyonun en önemli göstergesi; bir hücre ile hücre grupları arasında veya tümörde, dağılımın heterojenliğidir. Hücrelerde kahverengi DAB granülleri sitoplazmanın bütününde, perinükleer alanda veya hücrenin bir kutbunda görülebilir. Tümör hücrelerinde; soluk kahverengi veya sarı, diffüz, monoton boyanma büyük olasılıkla nonspesifiktir (58,60,70). Negatif kontrol ile karşılaştırmalar yapılarak; melanin, hemosiderin, pseudoperoksidaz (eritrositler), endojen peroksidaz (PMNL) ve mast hücre granülleri (Avidin/biotin metodları), gerçek pozitif reaksiyondan ayrılmalıdır (60).

Yanlış negatif sonuçlar şu durumlarda ortaya çıkabilir;

1- Antikorlar uygun değildir, denatüredir veya yanlış konsantrasyonlarda kullanılmışlardır;

2- Antijen'ler otoliz veya diffüzyon yoluyla kaybolmuşlardır;

3- Antijen yoğunluğu kullanılan teknik ve maddelerle tesbit edilebilen düzeyin altında olabilir.

Yanlış pozitif sonuçlar ise;

1- Antikorlar diğer antijenlerle çapraz reaksiyon verdiğinde;

2- Antikorlar dokulara nonspesifik bağlandıklarında;

3- Hücrelerde endojen peroksidaz aktivitesi kaldığında ve/veya avidin/biotin kompleksine afiniteleri görüldüğünde;

4- Tümör dokusunun değil de, tümör tarafından invaze edilen normal dokunun antijenleri antikorlar ile reaksiyona girdiklerinde;

5- Tümör tarafından invaze edilen dokuda ortaya çıkan soluble proteinlerin interstisyuma yayılması ve tümör hücreleri tarafından nonspesifik absorpsiyonu veya fagositozu söz konusu olduğunda ortaya çıkabilir (60, 61,70).

SAFRA KESESİ EMBRİYOLOJİSİ

Primitif barsak formları embriyoda dördüncü haftada gelişmeye başlarlar. Sindirim sistemi epitelinin ve glandlarının büyük bir kısmı primitif barsağın endodermin-den köken alır. Primitif ağız ve anal çukur epiteli ise ektoderm kökenlidir (23,46).

Deskriptif amaçla primitif barsak üç bölüme ayrılır. Bunlar sırasıyla ön barsak, orta barsak ve son barsak olarak adlandırılır. Farinks, alt solunum yolları, özofagus, mide, safra kanalının açıldığı kısmın proksimalinde yer alan duodenum kısmı, karaciğer, pankreas, safra kesesi ve safra kanalları ön barsak kısmından gelişirler.

Dördüncü haftanın başında, karaciğer, safra kesesi ve safra kanalları, duodenum taslağı kaudal kısmında ventral bir çıkıntı veya kabartı oluştururlar. Hepatik divertikulum adını verdiğimiz bu kabartı hızla büyür ve ventral mezenter yaprakları arasında iki parçaya bölünür. Büyük kranial parça ilkel karaciğeri; küçük kaudal parça safra kesesini, aradaki sap ise ductus cysticus'u oluşturur. Başlangıçta endodermal hücrelerle tıkalı durumdaki ekstrahepatik safra yolları, daha sonra duodenumda olduğu gibi bu hücrelerin vakuolizasyonu ve degenerasyonu sonucunda rekanalize olur. Karaciğerden salgılanan

safranın safra kesesi yoluyla duodenuma girişi onüçüncü haftadan sonra gerçekleşir (46).

CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN

Carcinoembryonic Antigen (CEA), ilk kez Gold ve Freedman tarafından 1965 yılında insan fetus barsağında ve erişkin kolon kanseri dokusundan elde edilmiş yaklaşık 200.000 D. ağırlığında, % 50-% 66 sını bir karbohidrat molekülünün oluşturduğu yaklaşık 9x40 nm boyutlarında multipl zincir içi disülfid bağları içeren halkasal tek bir zincirden oluşan heterojen bir asid glikoprotein molekülüdür (1,27,40,70,82).

Carcinoembryonic antijen'in varlığı çok çeşitli doku, organ ve durumlarda araştırılmıştır. İnflamatuar gastrointestinal hastalıklarda ve gastrointestinal ülserasyonlarda, benign polipozis ve karaciğer sirozunda, alkol ve/veya sigara kullananlarda, ve gebelikte ilk iki trimesterde; mide, ince ve kalın barsak karsinomalarında, pankreas, meme, testis, over, tiroid ve tükrük bezi tümörlerinde, bronşial karsinomalarda önemli derecede yüksek değerlerde saptanır (1,8,14,16,19,22,25,27,40,45,48,57,67,73,74,77,79).

Keşfinden kısa bir süre sonra CEA testinin kolorektal karsinomanın erken tanısında yararlı olabileceği düşünüldü. Serum ölçümleri, prevalansı yüksek kanserlerde diğerlerine oranla daha iyi bir indikatördür (1,22,27,29).

Düşük prevalanslı kanserlerde ve asemptomatik populas-yonda yanlış-pozitif ve yanlış-negatif sonuçların çok olması yüzünden serum CEA ölçümleri güvenilir değildir (22,45).

CEA serum değerlerinde yükselme kolorektal karsi-nomların % 50-80 inde, mide ve meme karsinomalarının % 25-50 sinde izlenmektedir (1,8,45,73,79). Mesane tran-sisyonel hücreli karsinomlarında bu oran % 24-% 85 dir (27,61).

Carcinoembryonic antigen kolorektal kanserlerin karaciğer metastazlarında duyarlı bir immunolojik belir-leyicidir (91). Postoperatif serum CEA analizleri rekür-ran lokal ve/veya metastatik kolorektal kanserlerin er-ken tanısında kullanışlı bir yöntemdir. Safra kesesinden alınan safra örneklerinde yapılan ölçümler de bu konuda çok duyarlı sonuçlar verir (22,31,91). Biyokimyasal ça-lışmalar normal safra içerisinde CEA ile ilişkili en az 3 makromolekül olduğunu göstermiştir. Bunlar, bilier trakt glikoproteinleri I,II ve III olarak isimlendirilir. Tip I, CEA'e benzer, normal safra içinde bulunur ancak tümörle ilişkili antijenik determinant içermez. Bu mole-kül karaciğer ve safra kanalikülleri dahil bilier sis-temin hemen tamamının epitelinde gösterilmiştir(2,3,76). İnflamasyon sırasında Tip I, yerini Tip II ve Tip III'e bırakır. Tip III immünolojik olarak CEA karakterine sa-hiptir (2,3).

Kolangiokarsinom vakalarında serum CEA değerlerinin yükselmesine rağmen diğer obstrüktif veya inflamatuvar durumlarda da değer artışı görülmesi serum ölçümlerinin tümör spesifitesini tartışılır kılmaktadır (31).

Primus ve arkadaşları tarafından 1975 yılında immünperoksidaz tekniklerin uygulanması, yine aynı yazarlar tarafından 1977 de antikor pürifikasyonu için yeni kriterler geliştirilmesi, 1978 de Wurster ve arkadaşlarının optimal fiksasyon prosedürlerini ortaya koyması paraplasta gömülmüş dokularda CEA lokalizasyonu immünohistolojik araştırmasını başlatmıştır (76,82).

Carcinoembryonic antigen'e karşı geliştirilen poliklonal antisera normal ve neoplastik dokularda bulunan çok sayıda antijen ile çapraz reaksiyon verir (1,22, 27,76,82). Bu antijenler arasında, nonspesifik crossreacting antigen (NCA) (Mach ve Pusztaszeri, 1972, von Kleist ve ark. 1972; Engvall ve ark. 1978), NCA-2 (Burtin ve ark. 1973, 1976; Matsuoka ve ark, 1982), normal faecal antigen-2 (NFA-2) (Matsuoka ve ark, 1978, 1982), biliary glycoprotein-1 (BGP-1) (Svenberg, 1976; Hammarström ve ark. 1978; Svenberg ve ark. 1979) ve tumour-extracted crossreacting antigen (TEX) (Kessler ve ark. 1978) iyi tanımlamışlardır (22,76,82). Bu çapraz reaksiyon veren antijenler CEA ile kısmi immünokimyasal benzerlik gösterirler. Bu yüzden doku veya hücrelerdeki CEA spesifik

olanlar ile CEA ile çapraz reaksiyon veren antijenik determinantların birbirlerinden ayrılabilmeleri için poliklonal anti-CEA antiseranın çapraz reaksiyon veren antijenlerle tekrar tekrar absorbe edilmesi gerekir (22,41,76). Monoklonal antikörlerin kullanılmaya başlanması (Köhler ve Milstein, 1975), hücre ve dokulardaki bu antijenlerin arasındaki immünolojik ilişkiyi araştırmada büyük kolaylık getirmiştir. Wagener ve arkadaşları 1983 yılında farklı epitop özellikleri olan beş ayrı monoklonal anti-CEA antikoru tanımlamışlardır (76,82). 1986 da bu sayı dokuza çıkmış ve bu sayede farklı normal ve neoplastik dokularda bulunan CEA in saptanması bu antikörler ile çok daha spesifik hale gelmiştir (41).

Normal ince barsak, kolon, mide ve safra kesesi epitellerinde kolumnar hücrelerin luminal bölgelerinde, yüzeysel, muhtemelen glikokalikslerde zayıf bir lineer CEA immünoreaktivitesi saptanır. Hücre içinde protein sentezi ile ilgili organellerde ve mukusda bulunur (3,27,33,39). İmmunoelektron mikroskopik çalışmalarda CEA kolon epiteli hücrelerinde ve iyi diferansiye adenokarsinom hücrelerinde, özellikle apikal yüzeyde küçük apikal veziküller içindeki mukus damlacıklarında ve golgi apareyinde gözlenmiştir (1,33,39). Bu bulgulara dayanarak CEA in golgi apareyinde sentezlenip buradan küçük veziküller ile apikal yüzeye taşındığı ileri sürülmektedir (1,39).

İmmünohistokimyasal yöntemle araştırılan CEA, kolon adenokarsinomlarında % 65 ile % 85, rektum karsinomlarında % 50, mide karsinomlarında ise yaklaşık % 30 oranında pozitif immün reaksiyon verir (1,8,27,29,39,40,45,69,79,82). Over tümörleri içerisinde müsinöz kistadenokarsinomlarda % 50-% 60, serviks yassı hücreli karsinomlarında yaklaşık % 50; akciğer tümörlerinde ise % 25 oranında izlenir (27,48,67).

HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN

Human Chorionic Gonadotropin (HCG), ilk kez Midgley ve Pierce tarafından 1962 de tanımlanan, placenta'nın sinsityotrofoblastlarında normalde büyük miktarlarda sentezlenen, esas görevi plasenta'nın steroid sentezini üstlenmesine kadar korpus luteumu korumak ve XY fetuslarda maskulinizasyonu sağlamak için Leydig hücrelerini stimüle etmek olan, 68.000 D ağırlığında bir glikoprotein hormondur (34,50,64,70). Alfa ve beta olarak tanımlanan iki subuniti bulunmaktadır. Alfa subuniti, insan hipofizer glikoprotein hormonları, FSH, LH ve TSH alfa zincirleri ile homologdur; N-terminallerinde 3 amino asit vardır ve toplam 92 amino asitten oluşmuşlardır. Her bir hormonda farklı olan beta subuniti HCG'de 145 aminoasitten oluşmuştur ve hormonun biyolojik aktivitelerinden sorumludur (34,64,70,83). İki subunit arasındaki non-kovalent bağlanma sonucu hormon aktif hale gelir (34).

Maksimum maternal yapım düzeyine 8. haftada erişir ve 16. haftadan gebeliğin sonlanmasına kadar yapımı azalarak sürer (15,64,78). Normalde plasenta beta subunite oranla çok daha fazla HCG-alfa sentezler, ancak bu farklılığın nedeni henüz bilinmemektedir (47).

Yoshimoto ve arkadaşları 1977 yılında kolon ve karaciğer gibi çeşitli normal dokularda HCG-benzeri bir maddenin ektopik varlığını RIA ile belirlemiştir (50). Bu maddenin varlığı daha sonra spermatozoa, normal testis, doğum yapmamış kadınların hipofizi, fetal karaciğer ve böbrek ekstrileri ve bakterilerde de saptanmıştır (35).

% 96-% 100 arasında HCG salgıladıkları belirlenen koryokarsinomalar uterus ve overlerde hamilelik sırasında veya sonrasında plasental elemanlardan gelişebilirler. Ayrıca testis, mediastinum, pineal bez ve hipofizde ve diğer germ hücreli tümörlerde özellikle teratomda da saptanabilirler (10,15,34,52).

Tüm koryokarsinomalarda sinsityotroblastik komponent HCG/HCG-beta ile kuvvetli pozitif boyanır (10,24,52). Seminomlarda yaklaşık % 5, embriyonal karsinomalarda % 21 oranında görülen sinsityotroblastik dev hücreler de intermediate trofoblastik tip geniş mononükleer hücreler gibi pozitif reaksiyon verirler (34,35,52). Ancak nontroblastik germ hücrelerinde reaksiyon negatiftir(35,52). Germ hücreli/plasental neoplazmlarda Niehans ve arkadaşları

da HCG/HCG-beta'nın oldukça duyarlı ve spesifik bir trofoblastik diferansiyasyon belirleyicisi olduğunu ileri sürmektedirler (52).

HCG trofoblastik tümörlerde tümör kitlesi boyutları ile serum düzeylerinin ilişkisi nedeniyle mükemmel bir dolaşımsal tümör belirleyicisidir (15,50). Kemoterapiyi takiben HCG RIA ölçümleri hastalığın prognozunun izlenmesinde değerli bir yöntemdir (13,15).

HCG yapımı ile birlikte giden mide, akciğer, özofagus ve mesanenin koryokarsinomatöz değişiklikler içeren karsinomaları da bildirilmiştir (15,47). HCG salgılayan, erkek çocuklarda puberte precox ile birlikte görülen trofoblastik diferansiyasyon içermeyen hepatoblastomlar da yayınlanmıştır (15,50).

Hematoksilen-Eosin preparasyonlarında gözden kaçan testiküler veya ovarian tümörlerdeki çok küçük koryokarsinom odakları bile, HCG immün boyanması sonucu kolayca saptanabilirler (15,35,50).

HCG salgılayan ekstragonadal tümörlerden bazıları trofoblastik hücrelerden oluşur (koryokarsinom); bazıları ise mikst histolojik patterne sahiptirler ve trofoblastik ve nontrofoblastik elementlerden oluşurlar; geriye kalanlar da nontrofoblastik elementler içerirler (50).

Klasik değerlendirmelere göre non-trofoblastik oldukları kabul edilen testiküler teratomların % 50 sinden fazlasında ve seminomların en az % 17 sinde HCG pozitif hücre grupları izlenir (15). Aynı Şekilde ovarian disgerminoma ve mikst germ-hücreli tümörlerde de HCG pozitif hücreler saptanır (15,50).

Ektopik HCG yapımı, trofoblastik diferansiyasyonları olmayan, akciğer kanserleri, hepatoblastomlar, mide, kolon, over, meme ve adrenal gland kanserlerinde, böbrek, prostat; mesane tümörlerinde, malign melanomlarda ve nadir olarak ince barsak leiomyosarkomları ile osteosarkomlarda saptanmıştır (15,24,25,47,52,56,78,85,90).

Hepatosellüler karsinomalarda % 10-20 ve kolanjikarsinomlarda % 1-10 oranında yüksek serum HCG değerleri saptanır (50).

Heyderman ve arkadaşları, primer ve metastatik non-germ hücre neoplazmalarında HCG doku immünoreaktivitesi ile serum değerleri arasında anlamlı ilişki saptamışlar, ancak bu değerler ile sağkalım arasında bir ilişki bulamamıŐlardır (35).

Ultrastrüktürel immünohistokimyasal çalışmalar plasenta sinsityotrofoblastlarında HCG in granüler endoplazmik retikulum sisternalarında ve plazma membranı maternal yüzünde lokalize olduğunu göstermiştir. Golgi apareyi

ve sitoplazmik veziküller boyanmaz (30,78). Yorde ve Husa'nın araştırmaları da bu bulguları desteklemiştir(77).

Trofoblastik diferansiyasyon içermeyen ekstragonadal tümörlerden kolorektal adenokarsinomalarda yaklaşık % 22-% 30, akciğer kanserlerinde % 7-84, mide karsinomlarında % 34, hepatosellüler karsinomalarda % 2,1, kolangio-karsinomalarda ise % 15-% 23 oranında HCG/HCG-beta doku immünoaktivitesi izlenmiştir (34,35,44,53,78).

Dokularında HCG varlığı saptanan kolorektal adenokarsinom vakalarında prognozun daha kötü olduğu belirlenmiştir ve bu tümörlerde doku HCG varlığının, prognostik önemi olan bir biyolojik belirleyici olabileceği ileri sürülmüştür (86).

Son 10 yılda HCG-alfa'nın nöroendokrin tümörlerde % 30 oranında bulunduğu serum RIA ve immünohistokimyasal metodlarla saptanmıştır. Ancak alfa subuniti nontrofoblastik ve nonendokrin tümörlerde gösterilememiştir (34). Alfa subunit varlığı saptanan tümörler arasında bronşial karsinoidler, pankreatik endokrin tümörler, tiroid medüller karsinomaları, mide, duodenum, kolon ve rektum karsinoidleri sayılabilir (15,34). Heitz ve arkadaşları sadece bu grup tümörlerde alfa subuniti'nin tümör-spesifik bir belirleyici sayılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ancak tek başına bu belirleyicilerin prognostik önemi bilinmemektedir (15,34,35).

SAFRA KESESİ KARSİNOMALARI

Safra kesesi kanserleri tüm gastrointestinal sistem neoplazmlarının % 1-3 ünü oluştururlar (12,51,61,81,87). Mide, kolon, rektum, özofagus ve pankreas kanserlerinden sonra 6. sırayı aldıkları bildirilmiştir(12,17,61). Biliopankreatoduodenal kanserler arasında ise yaklaşık % 23 oranında görülürler ve en sık rastlanan tümörler olarak kabul edilirler (31,87).

Otopsi sırasında asemptomatik primer safra kesesi karsinomu saptanma oranı ise % 0,5 dir (42,65).

Bu tümörlerin % 90'ı 50 yaşın üzerinde görülme eğilimindedirler (12,17,61,87); kadınlarda daha sık görülürler ve kadınlardaki tüm malignitelerin % 8-10 unu oluştururlar (17,42,61,81).

Çeşitli yazarlara göre ortalama 65-70 yaşları arasında görülmektedirler. Kadın/erkek oranı ise 2/1 ile 8/1 değerleri arasında değişmektedir (12,51,61,81,87).

Safra kesesi kanserlerinin görülme sıklığı ülkeden ülkeye değişiklikler gösterir. Genellikle beyaz ırkta siyah ırka nazaran daha sık görülür (17,61,81,87). Japonya erkek cinsten bu tümörden ölümlerin en sık olduğu ülkedir (87). Amerikan kıızılderililerinde diğer popülasyonlara göre 5-10 kat daha fazla görülür (17,61). Meksika'lı

kadınlarda kanser görülme yaşı 59.3, Avrupa kökenli kadınlarda ise 68.3 olarak saptanmıştır (12,61).

Cerrahi rezeksiyonu takiben 5 yıllık sağkalım oranları tanı konduğunda genellikle tümörün ileri stage'de olması nedeniyle % 2,6 ile % 30 arasında değişmektedir (12, 17,51,61,81,87).

Safra kesesi karsinomalarının % 80 ile % 90 ını adenokarsinomlar oluşturur. Bu grup neoplazm içerisinde iyi, orta ve az derecede diferansiye adenokarsinomlar, papiller, musinöz veya kolloid karsinomalar yer alır. % 16 oranında görülen diğer tümörler; adenoskuamöz, skuamöz ve andiferansiye karsinom ile nadir görülen melanokarsinom, karsinosarkom ve karsinoid tümörlerdir (4, 17,61,65,68,87). Bazı yazarlar adenokarsinomların hepsini iyi, orta ve az derecede diferansiye adenokarsinomalar sub gruplarına sokarlar (51,87). En sık görülen adenokarsinomalar orta ve az derecede diferansiye (Grade II-III) adenokarsinomlardır. Nevin ve arkadaşlarının serilerinde vakaların % 24.2 si Grade I; % 39,3 ü Grade II, % 36,3 ü Grade III adenokarsinomlardır (51). Bir başka seride bu değerler sırasıyla % 0, % 44, % 56 dır. (20). Yamaguchi ve Enjoji ise 103 vakadan oluşan serilerinde en çok iyi diferansiye adenokarsinomalarını saptandığını (Grade I, % 73,5), orta derecede diferansiye adenokarsinomaların (Grade II) % 17,3 az diferansiye adenokarsinomaların (Grade III) ise % 9,6 oranında görüldüğünü bildirmişlerdir (87).

Çoğu vakada safra kesesi duvarına direkt makroskobik veya mikroskobik yayılım izlenir. Mikroinvazif ve insitu formlar oldukça nadirdir (12). Opere vakalarda komşu karaciğer bölgesine yayılım % 34 ile % 89 oranında saptanır. Karaciğere yayılım; direkt komşulukla, lenf kanallarıyla ve/veya Luschka kanalları ile olur (12,65). Peritoneal seroza'dan aşağıya doğru peritoneal diffüzyon ile yayılım vakaların % 25-30'unda görülür. Vakaların %10-20 sinde kolon, duodenum, pankreas ve mideye yayılım gözlenir (12,87). % 25 ile % 50 vakada tümör ana safra kanalına yayılmıştır (12,61). Tümör lokal lenf nodlarına çok erken metastaz yapar. Vakaların % 42 ile % 79'unda sistik nod tutulumu gözlenir. Superior pankreatikoduodenal nodlar % 25-40 vakada; superior mezenterik ve çöliak nodlar % 5-10 vakada tutulur (65,87). Safra kesesi yatağından uzaktaki karaciğer kısımlarına metastaz vakaların % 50 sinde gözlenir. Torasik metastaz çok nadirdir (12,61,65,87).

Safra kesesi kanserlerinin Nevin ve arkadaşları tarafından yapılan evrelendirmesi şu şekildedir (51):

Stage I : Tümör mukozada lokalizedir.

Stage II : Tümör mukoza ve muskuler tabakayı infiltrate etmiştir.

Stage III : Mukoza, müsküler tabaka ve seroza tutulumu vardır.

Stage IV : Stage III'e ek olarak sistik lenf nodu tutulumu vardır.

Stage V : Stage III'e ek olarak karaciğer ve diğer organ tutulumları vardır.

Yamaguchi ve Enjoji 1988 de yeni bir klinikopatolojik evrelendirme önermişlerdir (87). Buna göre ise;

Stage I : Tümör safra kesesi muskuler tabakası içerisinde, Rokitansky- Aschoff sinuslarından serozaya yayılım vardır veya yoktur;

Ia : Mukozada veya Kas tabakası içindeki Rokitansky -Aschoff sinuslarında ve/veya subseroza da, karsinoma insitu;

Ib : Submukozaya veya kas tabakasına mikroinvazyon gösteren karsinoma;

Stage II : Tümör ekstramüsküler fibroadipöz tabakaya yayılmıştır, ancak komşu organlara yayılım yoktur;

Stage III: Tümör karaciğer, duodenum ve/veya kolona yayılmıştır.

Prognoz, Grade I tümörlerde en iyidir (12,42,65).

Nevin'e göre 5 yıllık sağkalım % 62,5, Yamaguchi ve Enjojiye göre 3 yıllık sağkalım % 52.2 dir (51,87). Az diferansiye adenokarsinomlarda ise bu oranlar sırasıyla % 6.2 ile % 33 tür (20,51,87).

Nevin tümörlerin Stage ve Grade değerlerini birleştirerek düşük, intermediate ve yüksek değerli grup şeklinde yeni bir sınıflandırma oluşturarak grade ile klinik evrelendirme arasındaki korelasyonu tartışmıştır. Buna göre düşük değerli grupta, 5 yıllık sağkalım; % 78, intermediate değerli grupta; % 8, yüksek değerli grupta ise,

1 yıllık sağkalım % 63; 2 yıllık sağkalım % 0 dır (51). Yamaguchi ve Enjoji'nin klinikopatolojik evrelendirme değerleri de bu bulgularla paralellik gösterir; Stage I de 3 yıllık sağkalım % 100, Stage II de % 40, Stage III de % 10 olarak bulunmuştur (87).

Ancak bugüne kadar klinik evrelendirme ile tümörün diferansiyasyon derecesi arasındaki ilişkiyi ortaya koyabilecek genel kabul görmüş bir yaklaşım yöntemi ortaya konmamıştır (6,9,65,81,85).

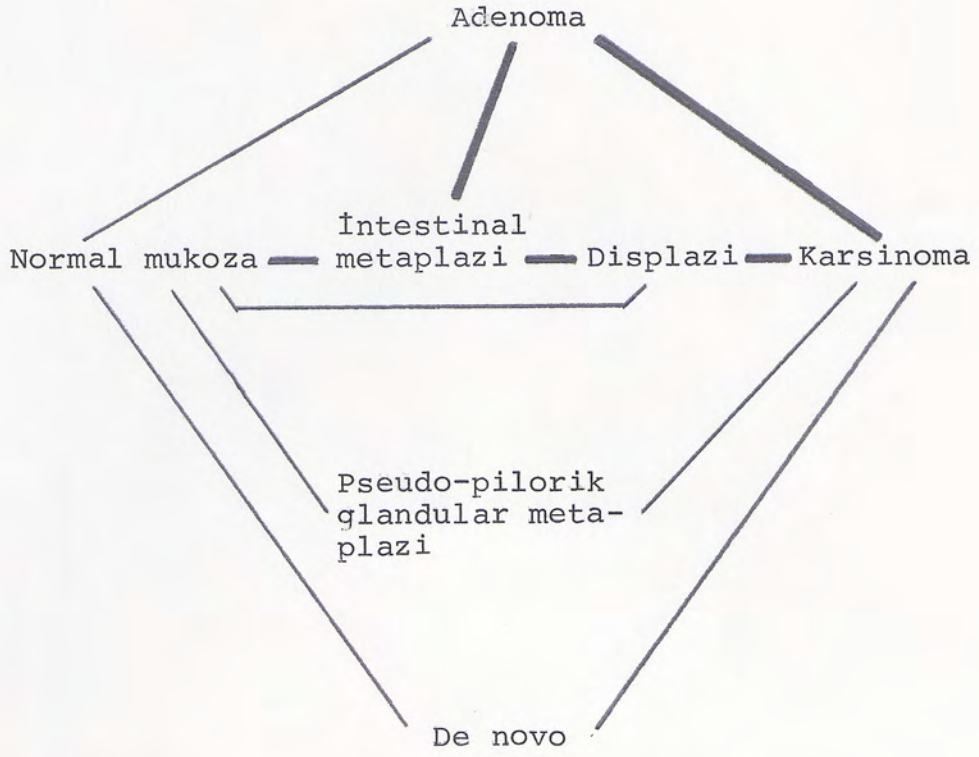
Safra kesesi adenokanserlerinin etiolojisi henüz aydınlatılamamıştır. Ancak aralarındaki ilişki kesin olmakla beraber vakaların % 64.1 ile % 100 üne kolelithiasis eşlik etmektedir (20,65,89). Diğer kanserlerde olduğu gibi safra kesesi adenokanserlerinde de, virus ve kimyasal ajanlar vb. gibi ekstrensek faktörler; irritasyon ve inflamasyon gibi durumları takiben hücrel diferansiyasyon yeteneğinin azalması; çeşitli hormonlar gibi intrensek faktörler ve herediter predispozisyon sorumlu tutulabilir (17,20,89). Adenokarsinom ile kolelithiasis birlikteliği önemlidir; çünkü taş varlığı nedeniyle oluşan mukozal defekt sonrası iyileşme, inflamasyon ile beraber gider ve intestinal metaplazi ortaya çıkar. Metaplastik değişiklikler safra taşı yoksa nadirdir (5,85,88,89). Intestinal metaplazi safra kesesinde daha çok fundus da lokalize olur. Bu yerleşim displazi ve karsinoma ile benzerdir (5,84).

İntestinal metaplazi bulunma oranı, taşsız kolesistitde % 4, taşlı kolesistitde % 30.4, displazide % 69,8 ve adenokarsinomada % 61.1 olarak bildirilmiştir (5,84,85,88). % 30.5 adenokarsinoma vakasında da tümör dokusunda displazi ve adenoma birlikte saptanmıştır (3,6,63,84).

Safra kesesi adenokarsinomalarının çoğu iyi diferansiyedirler (20,89). İntestinal metaplaziler de genellikle iyi diferansiye adenokarsinomalara eşlik ederler (5,85,88,89). Yapılan immünohistokimyasal çalışmalar adenom vakalarının % 31 inde, displazi vakalarının % 80 inde ve adenokarsinoma vakalarının % 97.2 sinde intrasitoplazmik Carcinoembryonic Antigen immünoreaktivitesi göstermiştir (3,7,66,84,85).

Albores-Saavedra ve arkadaşları safra kesesi adenokarsinomlarının epitelyal hiperplazi, atipik epitelyal hiperplazi veya displazi, karsinoma insitu ve infiltratif karsinoma basamaklarını izleyerek geliştiğini ileri sürmektedirler (3,5,6). Laitio da displazi ve adenokarsinomun kronik inflamasyonlu safra keselerinde sık rastlanan metaplastik epitelden kaynaklandığına inanmaktadır (Şekil 2) (20,85).

Varlıklarında tümör gelişme riskini artırdığı ileri sürülen durumlardan bazıları da kolesistoenterik fistüller, porselen safra kesesi, ülseratif kolitis, kolon



Şekil 2: Safra kesesi karsinomunda histogenezis
Kalın çizgilerin karsinogenezisde önemli olabileceği ileri sürülmektedir (85).

polipleri, Gardner's sendromu ve ana safra kanalı ile pankreatik duktus arasındaki birleşme anomalileridir (17, 61,65).

Hsu ve Raine tarafından 1981 de tanımlanan ve bugün için en duyarlı immünohistokimya metodlarından biri olan Avidin-biotin-peroksidaz kompleksi (ABC) metodu (37, 70) kullanılarak primer safra kesesi adenokarsinomlarında CEA ve HCG araştırılmıştır.

M A T E R Y A L ve M E T O D

Araştırmamızda 1976-1990 yılları arasında S.B. Ankara Hastanesi Patoloji Laboratuvarı'nda Primer Safra Kesesi Adenokarsinomu tanısı almış 15 lezyon incelendi.

Cerrahi eksizyon ile elde edilmiş olan doku örnekleri rutin olarak % 10'luk formaldehid solüsyonunda tespit edilmişti. Bu vakaların patolojik tanı almış preparatları ile parafin bloklarından elde edilen yeni seri kesitlerinden bir bölümü, hematoksilin-eosin (HE) ile boyanarak tekrar değerlendirildi ve ışık mikroskobu ile incelenerek, modifiye Broder sistemi kullanılarak (17,51) grade'lerine göre (iyi, orta ve az diferansiye adenokarsinomalar) sınıflandırıldı. Daha sonra diğer bölüm seri kesitlerde Avidin/Biotin İmmünoperoksidaz Sistem tekniği ile Carcinoembryonic Antigen (CEA) ve Human Chorionic Gonadotropin (HCG) varlığı araştırıldı.

Avidin/Biotin İmmünperoksidaz Sistem Tekniği:

Test ve pozitif kontrol örnekleri olarak, CEA için kolon adenokarsinomu, HCG için I. trimester placenta örnekleri parafin bloklarından elde edilen 4 mikrometre kalınlığındaki, seri kesitler sırasıyla aşağıdaki işlemlerden geçirildi.

Kesitler;

- 1) 56°C de etüvde 18 saat tutuldu,
- 2) Ksilol ile deparafinize edildi,
- 10 dakika, iki kez
- 3) Absolü alkol ile birkaç kez yıkandı,
- 4) 96° Alkol ile hidrate edildi,
- 10 dakika, iki kez
- 5) Su ile yıkandı,
- 6) Önceden su ile nemlendirilmiş humid chamber içi-
ne yerleştirildi.
- 7) PBS* ile 5 dakika yıkandı,
- 8) Üzerlerindeki PBS giderildikten sonra endojen
peroksidi bloke etmek için distile suda % 3 lük
hidrojen peroksit ile 5 dakika inkübe edildi,
- 9) PBS ile 2 dakika yıkandı,
- 10) Üzerlerindeki PBS giderildikten sonra nonspesi-
fik antikor boyanmasını önlemek için protein
blocking agent (PBA) ile 5 dakika inkübe edildi,
- 11) Çevreleri dikkatle silindikten sonra;

A- Test seri kesitlerinden bir bölümüne ve pozitif kontrol kesitleri üzerine primer antikor uygulandı.

(★) Phosphate Buffer Saline:

NaCl..... 17 gr
Na₂HPO₄, 2H₂O..... 6,8 gr
KH₂PO₄..... 2,48 gr
Distile Su..... 1000 mL.
(pH: 7.2 olacak şekilde ayarlandı)

B- Test seri kesitlerinden bir bölümüne Pozitif Antikor/Metod Kontrolu için pozitif kappa/Lambda uygulandı,

C- Test seri kesitlerinden bir bölümüne de Negatif Antikor Kontrolu için PBS uygulandı,

Daha sonra humid chamber içinde oda sıcaklığında, 30 dakika inkübe edildi,

12- PBS ile üçer kez 2 dakika yıkandı,

13- Sekonder antikor (Biotin ile işaretli Anti-Rabbit, Goat ve Mouse, polyvalent) ile 30 dakika inkübe edildi,

14- PBS ile üçer kez 2 dakika yıkandı,

15- Universal Peroxidase Reagent ile 30 dakika inkübe edildi,

16- PBS ile üçer kez 2 dakika yıkandı,

17- DAB solüsyonu ile 4 dakika oda ısısında inkübe edildi,

18- Su ile yıkandı,

19- Mayer's hematoksilin ile 2 dakika zıt boyama yapıldı,

20- Su ile yıkandı,

21- 96° Alkol ile dehidrate edildi,

- 10 dakika, iki kez

22- Absolü alkol ile birkaç kez yıkandı,

23- Ksilol ile şeffaflandırıldı, ve

- 10 dakika, iki kez

24- Sentetik mounting medium ile kapatıldı.

Preparatlar daha sonra ışık mikroskobu ile incelendi. Boyanma patterni tümör dokusunda herhangi bir lokalizasyonda odaksal ise "fokal"; yaygın ise "diffüz" boyanma olarak yorumlandı. Boyanmanın görüldüğü lokalizasyonda boyanma yoğunluğu ise;

" (+): Hücrelerin yaklaşık % 25'inde boyanma

(++): Hücrelerin yaklaşık % 50'sinde boyanma

(+++): Hücrelerin yaklaşık % 75'inden fazlasında
boyanma

(++++): Hücrelerin hemen hepsinde boyanma olmalıdır"

kriterleri (62,76) kullanılarak değerlendirildi.

Yukarıda tanımlanan teknik için, Lipshaw-Omnitags Avidin/Biotin Immunoperoxidase Staining System; primer antikolar olarak, CEA: Carcinoembryonic Antigen-Lipshaw-Rabbit, IgG, immünoglobulin fraksiyonu, HCG: Human Chorionic Gonadotropin-Lipshaw-Rabbit, IgG, immünoglobulin fraksiyonu; sekonder antikor olarak Lipshaw-Anti-Rabbit,

Goat, Mouse, Sheep, Guinea Pig, Rat Monoclonal, polyvalent, peroksidaz ajanı olarak, Avidin/Biotin Peroxidase Reagent; ve chromogen olarak da, DAB-H₂O₂ kullanılmıştır.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda yapılmıştır.

BULGULAR

Incelediğimiz 15 primer safra kesesi adenokarsinomu vakasında Kadın/Erkek oranı 2.75, vakaların yaşlarına göre dağılımında ortanca yaş 60 olup, ortalama yaş ise 58.5 olarak saptanmıştır (Tablo I). 7 vaka Grade I (% 46), 4 vaka Grade II (% 27) ve 4 vaka da Grade III (% 27) olarak sınıflandırılmıştır (Tablo II).

Antikorlarımızın hiçbiri non spesifik çapraz reaksiyon verecek bir antijenle reaksiyon vermemiştir, dokudaki normal polimorfonükleer lökositler antikorlarımızla boyanmadılar. Pozitif kontrol kesitlerimiz her iki antikor ile de oldukça kuvvetli ve spesifik bir boyanma gösterdiler. Kappa/Lambda uygulanan kesitlerimizde de belediğimiz üzere zemin plazma hücrelerinde kuvvetli intrasitoplazmik boyanma gözlemlendi. Negatif kontrol kesitlerinde boyanma olmamıştır. Deneysel amaçla çalışma grubumuza eklediğimiz bir normal safra kesesi dokusunda epitelde bazı hücrelerin sitoplazmalarının apikal yüzeyinde muhtemelen prizmatik hücrelerin filamentöz glycocalyx'lerinde, lineer, zayıf bir pozitif Carcinoembryonic Antigen (CEA) reaksiyonu gözlemlendi, Human Chorionic Gonadotropin reaksiyonu izlenmedi. Buna karşın bir kronik kolesistitis vakasında epitelde normal epitele oranla biraz daha kuvvetli

ve yoğun boyanma saptandı. Pozitif CEA immünoreaktivitesi normal epiteldeki gibi fokal alanlarda ancak yer yer inflamasyon alanlarına komşu bölgelerde yaygın olarak izleniyor; çoğu prizmatik hücrelerin sitoplazmasında ve lamina propriadaki glandlarda gözleniyordu. Bir vakada pozitif HCG immünoreaktivitesi de CEA kadar kuvvetli olmasada saptanmıştır.

Primer safra kesesi adenokarsinomalarının hepsinde tümör hücrelerinin yüzeyinde, sitoplazmalarında ve gland sekresyonlarında CEA, pozitif reaksiyon vermiştir (Resim 1,10). Grade I ve II tümörlerin hepsinin fokal boyandığı, Grade I tümörlerde bu boyanmanın (++) ile (++++) arasında değiştiği; buna karşın Grade II tümörlerin hepsinde fokal (+++) boyanma gözlendiği, Grade III tümörlerde biri hariç 3 vakada (% 75) diffüz boyanmanın ortaya çıktığı, bu vakalarda boyanma yoğunluğunun da diffüz (+++) ile diffüz (++++) arasında değiştiği saptandı (Tablo III-IV) (Resim 1-3,5,9,13). Grade II ve III tümörlerde derin dokuları infiltre eden tek tek veya gruplar halindeki tümör hücrelerinin kuvvetli CEA pozitif immünoreaktivite gösterdiği izlenmiştir (Resim 2,8,11,16). Diffüz (++++) boyanma patterni gösteren Grade III az diferansiye bir adenokarsinom vakasında tümör dokusuna komşu epitelde zayıf bir boyanma reaksiyonu; buna karşın infiltrasyon gösteren tümör hücre adacıklarının gittikçe artan bir immün reaksiyon kazandıkları gözlenmiştir (Resim 14,15,17).

HCG immünoaktivitesi sadece 5 vakada (% 33,3) izlenmiştir. Grade yükseldikçe boyanma yoğunluğunun arttığı görülmüştür (Tablo 5). Orta ve iyi diferansiye adenokarsinom vakalarında zayıf bir boyanma patterni saptanmıştır. Pozitif HCG immünoaksiyonu veren hücrelerin boyanma özelliği değişkendir. Yer yer zayıf, yer yer kuvvetli reaksiyon gözlenmektedir (Resim 4,6,7). Bir vakada diffüz (++) boyanma izlenmiştir. İmmünoaktif hücrelerin çoğu prizmatik tipteydi ve pozitif kahverengi granüller sitoplazma içinde diffüz, yer yer üniform bir dağılım göstermekteydiler (Resim 4,12). HCG immünoaktivitesi pozitif 5 vakadan 4 tanesi kadındı.

CEA ile birlikte HCG pozitif immünoaktivitesi 5 vakada saptandı (% 33,3). Bu vakalarda boyanma patterni ilişkisi incelendiğinde her iki markerin fokal boyandığı vaka sayısı 4 (% 80), diffüz boyandığı vaka sayısı ise 1 (% 20) idi (Tablo VI, VII). Bu vakaların tümör grade-lerine göre dağılımı ise şöyledir. Grade I; 2 vaka (% 40), Grade II; 2 vaka (% 40) ve Grade III; 1 vaka (% 20) (Tablo VIII).

Vaka sayılarının azlığı nedeniyle elde edilen sayısal sonuçların istatistiksel önemleri istatistiksel olarak analiz edilememiştir.

Tablo I: Vakaların Cinsiyetlerine göre dağılımı.

| Cins | Sayı | % |
|--------|------|------|
| E | 4 | 26,6 |
| K | 11 | 73,3 |
| TOPLAM | 15 | 99,9 |

Tablo II: Vakaların tümör grade'lerine göre dağılımı

| Grade | Sayı | % |
|--------|------|------|
| I | 7 | 46,6 |
| II | 4 | 26,6 |
| III | 4 | 26,6 |
| TOPLAM | 15 | 99,8 |

Tablo III: Vakaların grade'leri, klinik ve immünohistokimyasal boyanma özellikleri

| Vaka No | Yaş | Cins | Grade | CEA | HCG |
|---------------|-----|------|-------|----------|-------|
| 1- 1672/1982 | 30 | K | I | F +++ | F + |
| 2- 1049/1983 | 52 | K | I | F ++/+++ | - |
| 3- 2083/1983 | 40 | K | I | F ++++ | F + |
| 4- 3085/1978 | 68 | E | I | F ++ | - |
| 5- 369/1990 | 75 | K | I | F ++ | - |
| 6- 1057/1984 | 51 | K | I | F ++ | - |
| 7- 1613/1980 | 65 | E | I | F +++ | - |
| 8- 3102/1983 | 68 | E | II | F +++ | F + |
| 9- 288/1976 | 56 | K | II | F +++ | - |
| 10- 3007/1977 | 65 | K | II | F +++ | - |
| 11- 642/1990 | 70 | K | II | F +++ | F +++ |
| 12- 2956/1983 | 73 | K | III | F + | - |
| 13- 2162/1984 | 60 | K | III | D +++ | - |
| 14- 3613/1988 | 45 | K | III | D +++ | D ++ |
| 15- 534/1987 | 60 | E | III | D ++++ | - |

Tablo IV: CEA dağılım patterninin tümör grade'i ile ilişkisi

| CEA | Grade I | Grade II | Grade III |
|---------------|---------|----------|-----------|
| <u>Fokal</u> | | | |
| F + | - | - | 1 |
| F ++ | 3 | - | - |
| F +++ | 3 | 4 | - |
| F ++++ | 1 | - | - |
| <u>Diffüz</u> | | | |
| D + | - | - | - |
| D ++ | - | - | - |
| D +++ | - | - | 2 |
| D ++++ | - | - | 1 |

Tablo V: HCG dağılım patternini tümör grade'i ile ilişkisi

| HCG | Grade I | Grade II | Grade III |
|---------------|---------|----------|-----------|
| <u>Fokal</u> | | | |
| F + | 2 | 1 | - |
| F ++ | - | - | - |
| F +++ | - | 1 | - |
| F ++++ | - | - | - |
| <u>Diffüz</u> | | | |
| D + | - | - | - |
| D ++ | - | - | 1 |
| D +++ | - | - | - |
| D ++++ | - | - | - |

Tablo VI: CEA (+) vakalarda HCG (+) liğinin birlikte görölme ilişkisi

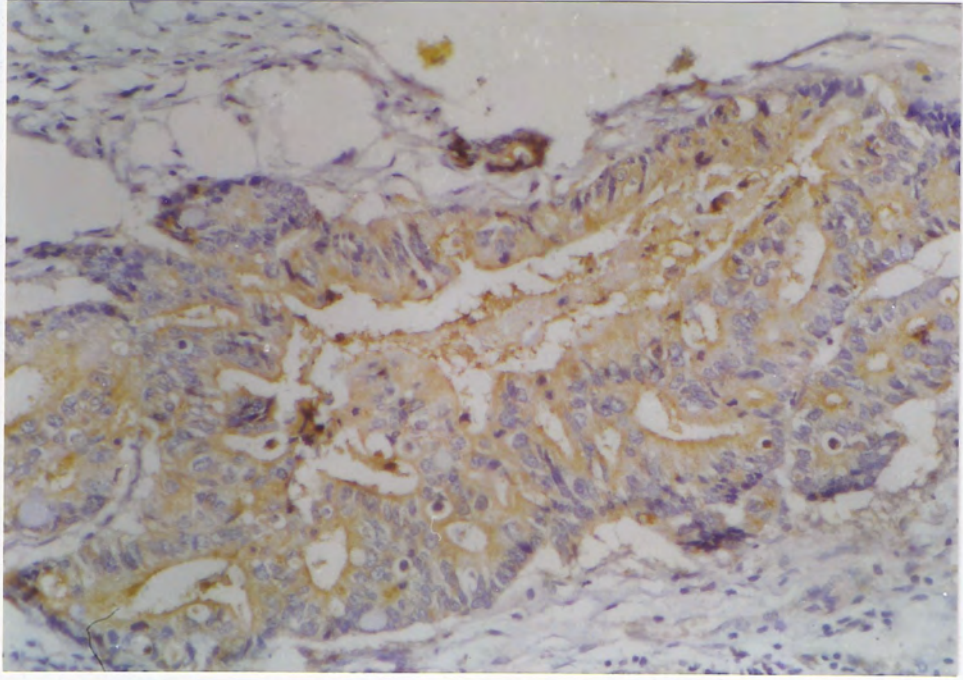
| | S | % |
|--------|----|------|
| HCG + | 5 | 33,3 |
| HCG - | 10 | 66,6 |
| TOPLAM | 15 | 99,9 |

Tablo VII: CEA ve HCG birlikte (+) vakalarda boyanma patterni ilişkisi

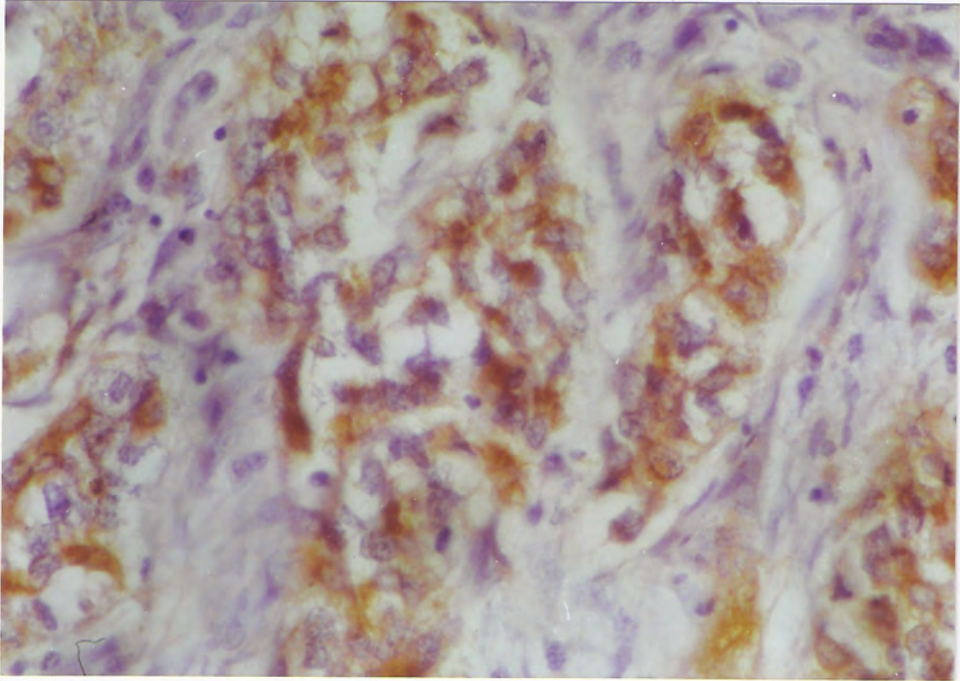
| HCG | CEA | |
|--------|-------|--------|
| | Fokal | Diffüz |
| Fokal | 4 | - |
| Diffüz | - | 1 |

Tablo VIII: CEA ve HCG birlikte (+) vakalarda tümör grade ilişkisi

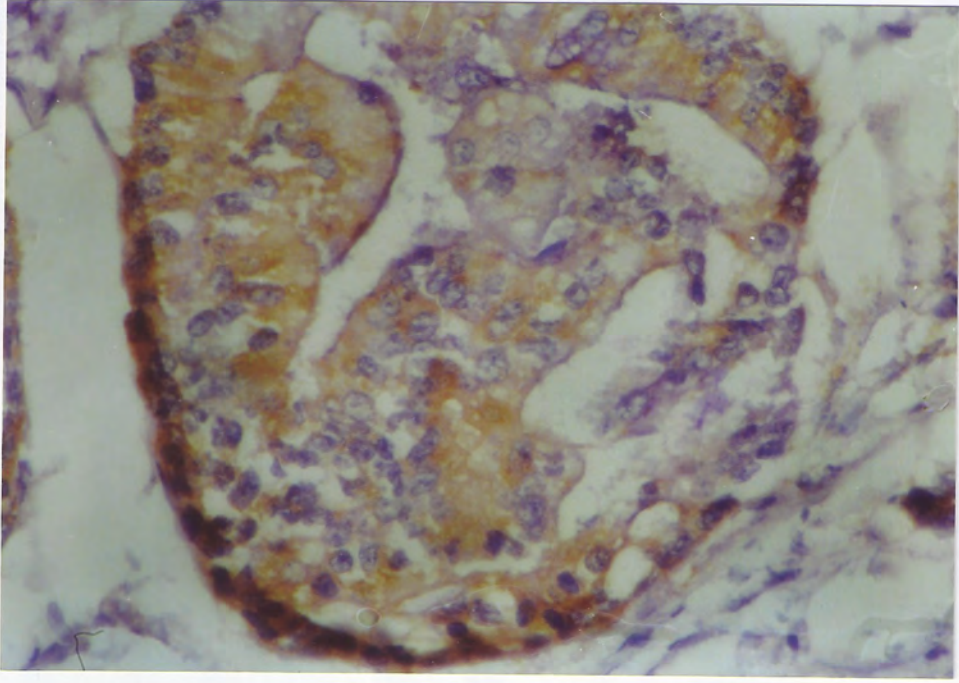
| HCG | CEA | | |
|-----------|---------|----------|-----------|
| | Grade I | Grade II | Grade III |
| Grade I | 2 | - | - |
| Grade II | - | 2 | - |
| Grade III | - | - | 1 |



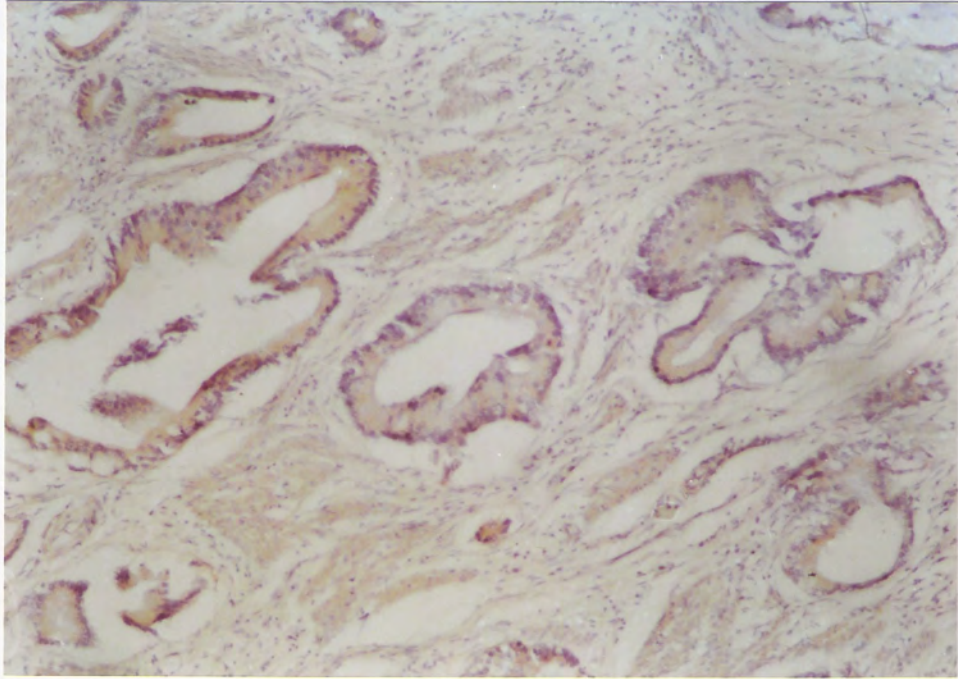
Resim 1: Grade I; CEA; Fokal ++/+++ boyanma; 230x
(Vaka No: 2; 1049/1983).



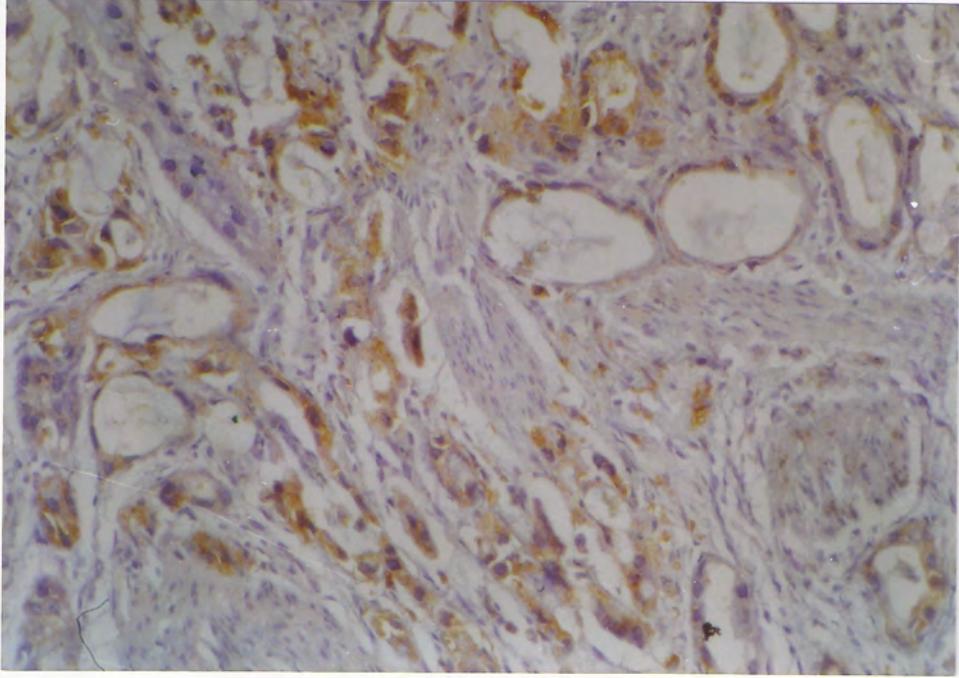
Resim 2: Grade I; CEA; Fokal ++++ boyanma; 460x
(Vaka No: 3; 2083/1983).



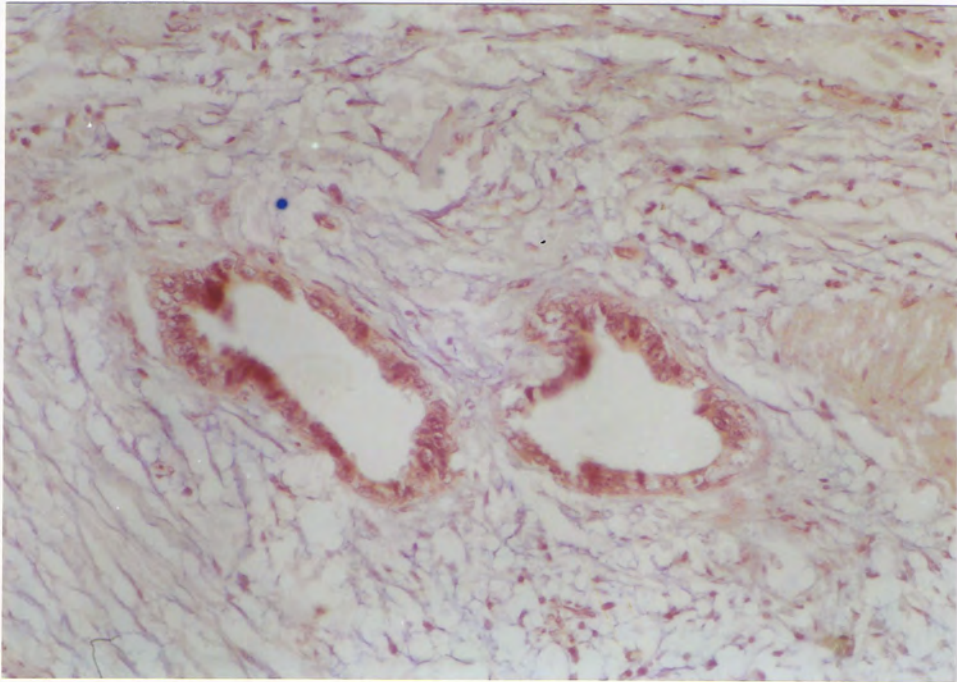
Resim 3: Grade I; CEA; Fokal +++ boyanma 460x
(Vaka No: 1; 1672/1982)



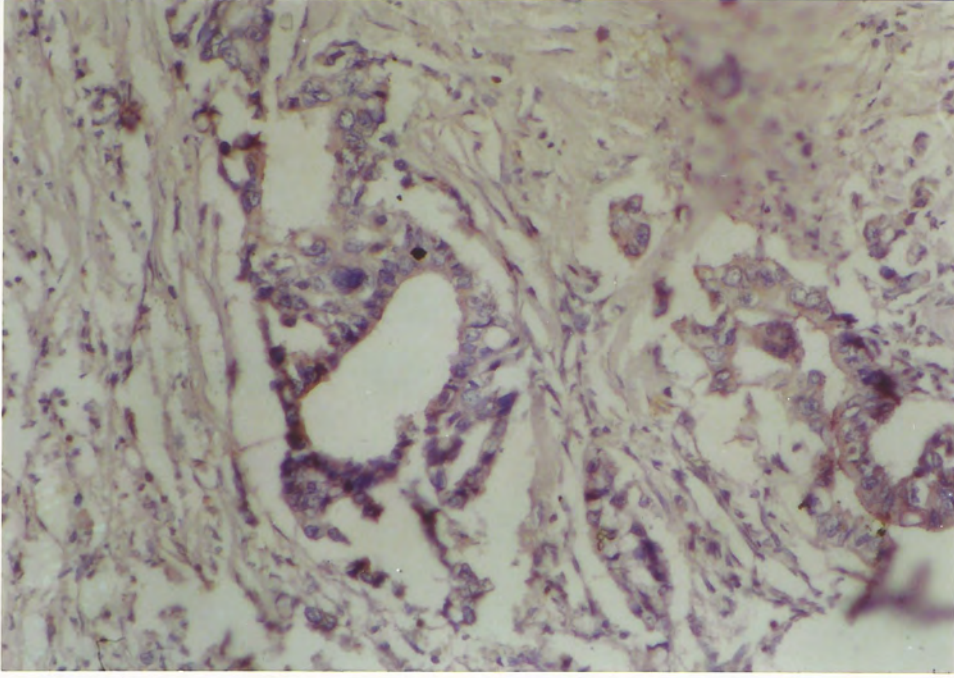
Resim 4: Aynı Vaka; HCG; Fokal + boyanma; 115x



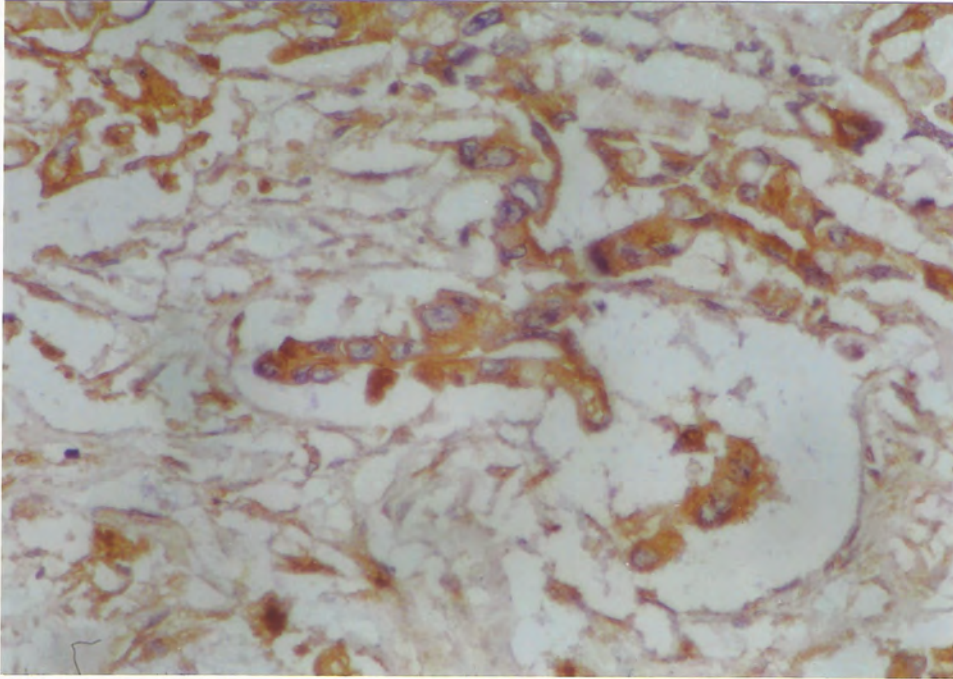
Resim 5: Grade I; CEA; Fokal ++ boyanma; 115x
(Vaka No: 5; 369/1990)



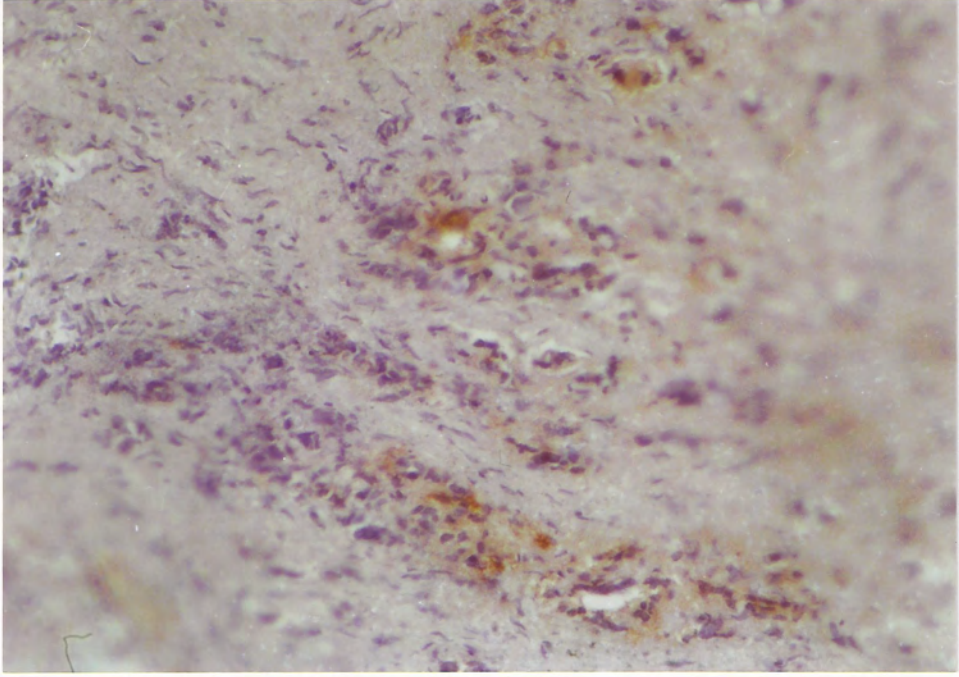
Resim 6: Grade II; HCG; Fokal +++ boyanma; 230x
(Vaka No: 11; 642/1990)



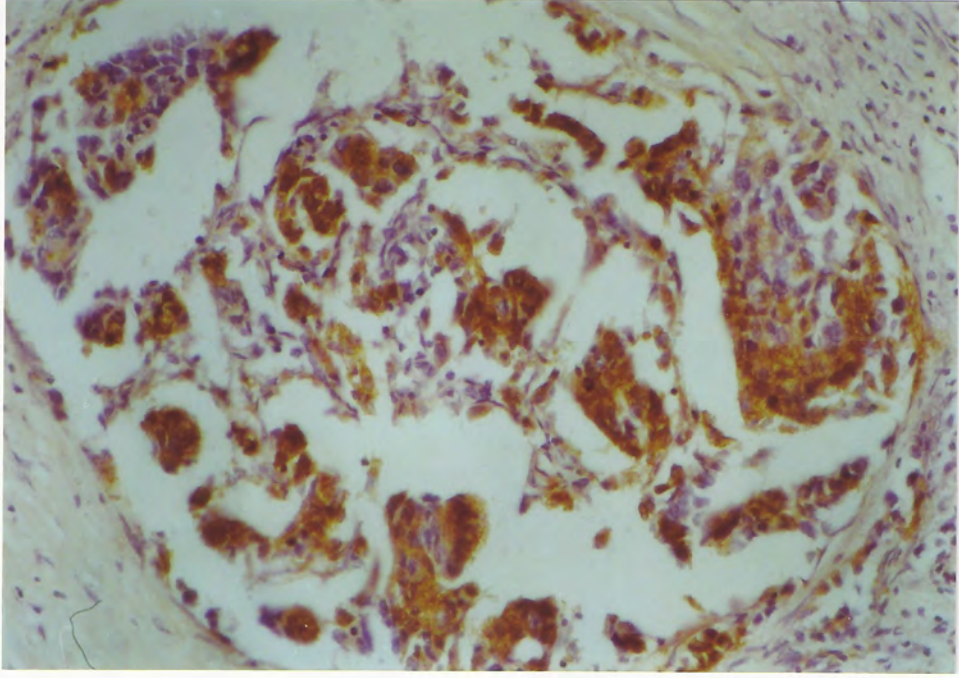
Resim 7: Grade II; HCG; Fokal + boyanma; 230x
(Vaka No: 8; 3102/1983)



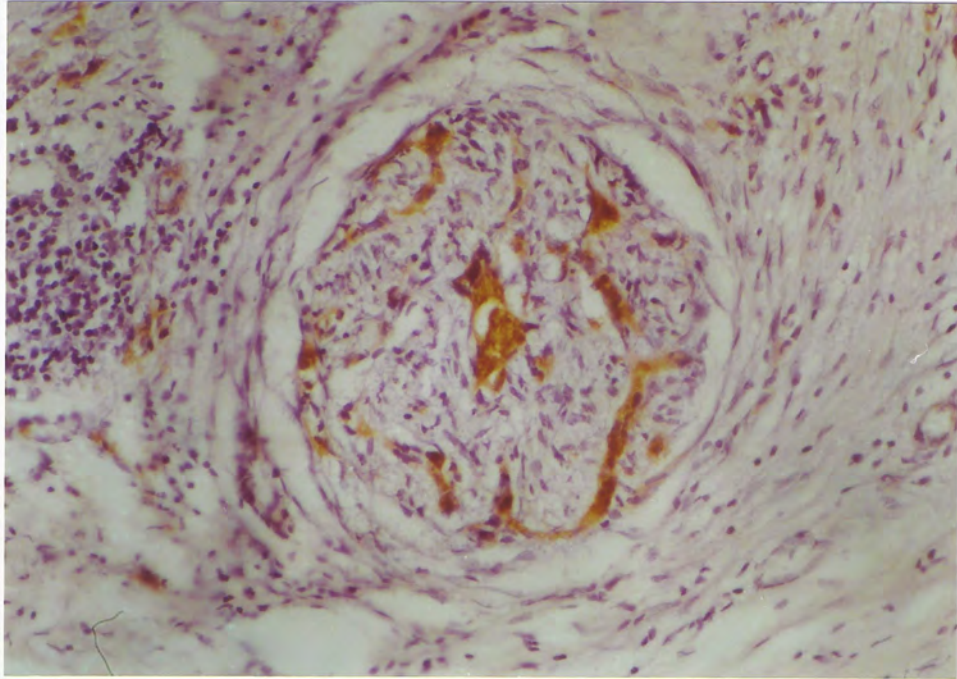
Resim 8: Aynı vaka; CEA; Fokal +++; 460x



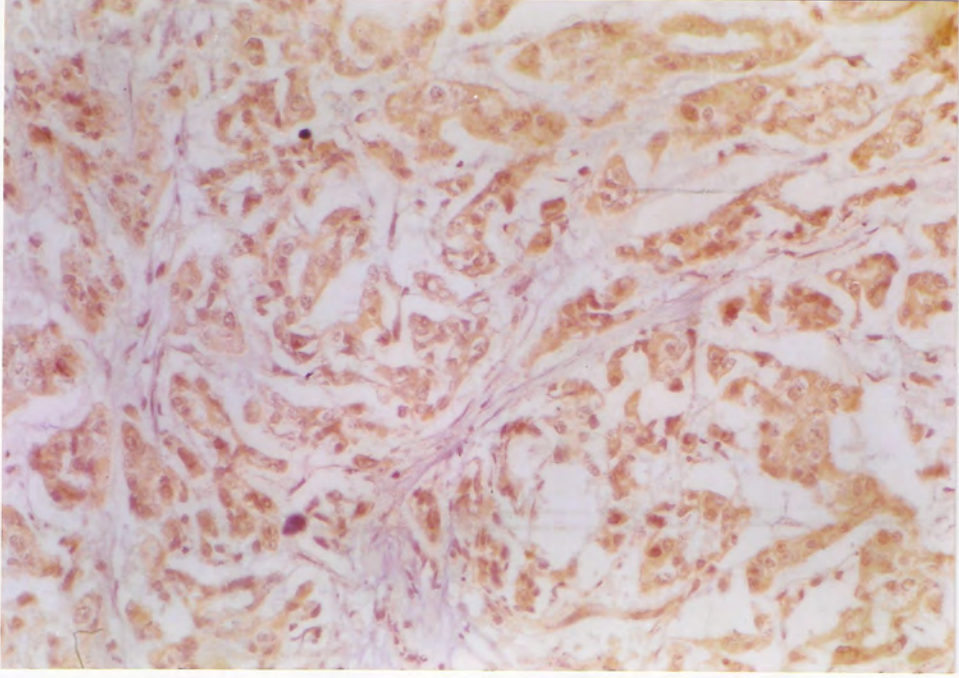
Resim 9: Grade III; CEA; Fokal + boyanma; 230x
(Vaka No: 12; 2956/1983)



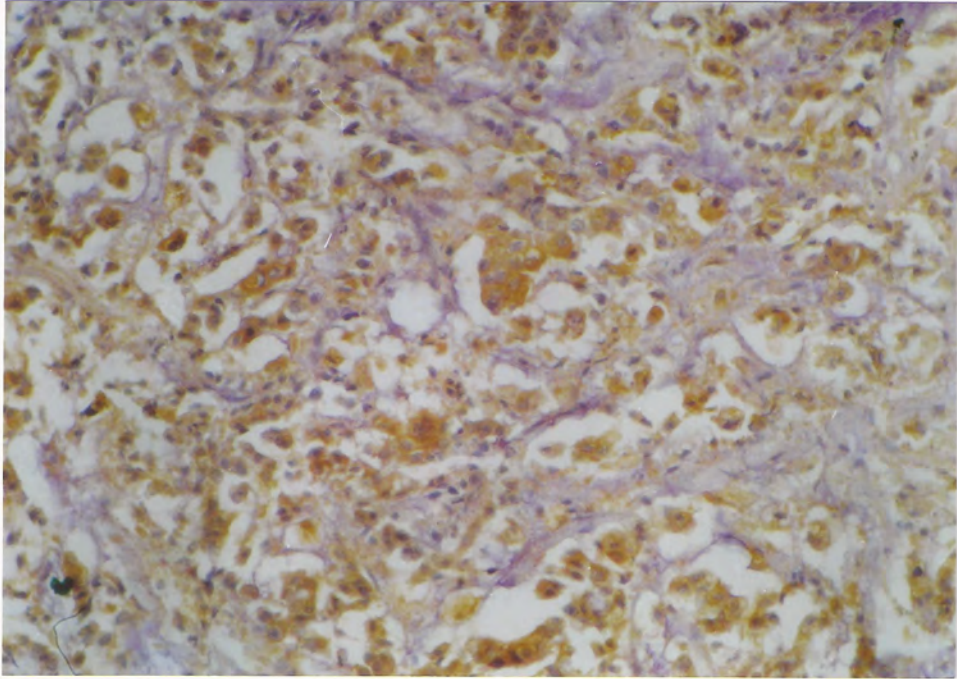
Resim 10: Grade III; CEA; Diffüz +++ boyanma; 230x
(Vaka No: 13; 2162/1984)



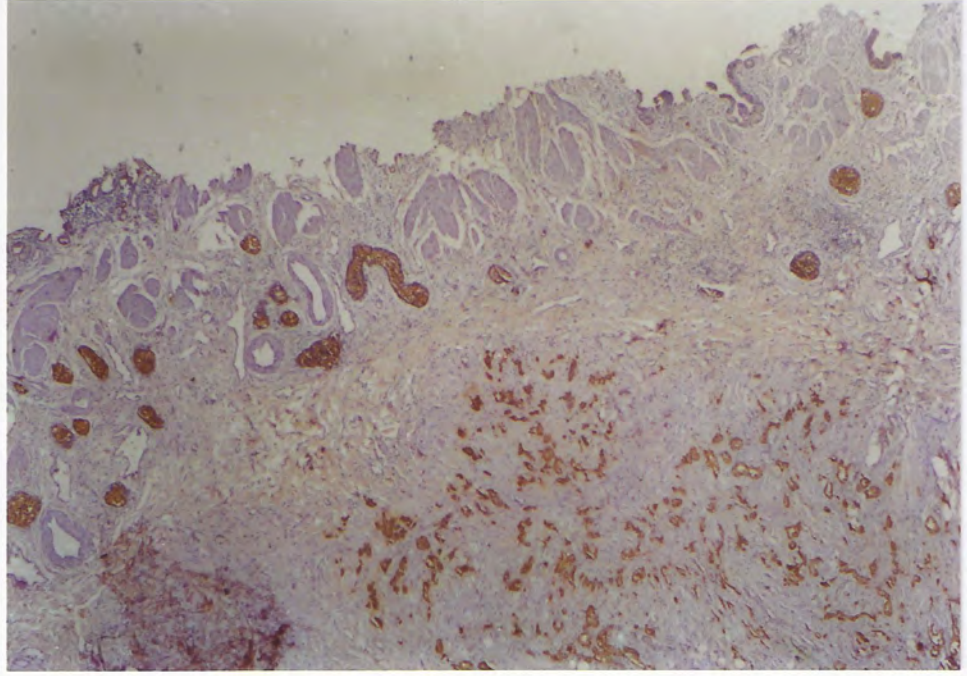
Resim 11: Aynı vaka; tümör hücrelerinin sinir dokusuna
invazyonu dikkati çekmektedir; CEA; 230x



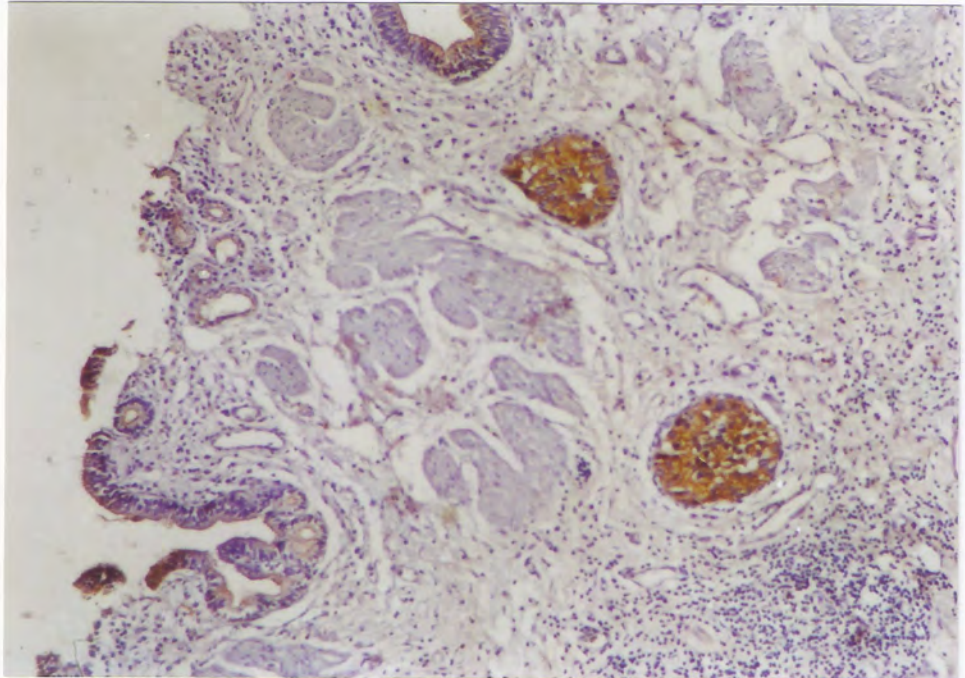
Resim 12: Grade III; HCG; Diffüz ++ boyanma; 230x
(Vaka No: 14; 3613/1988)



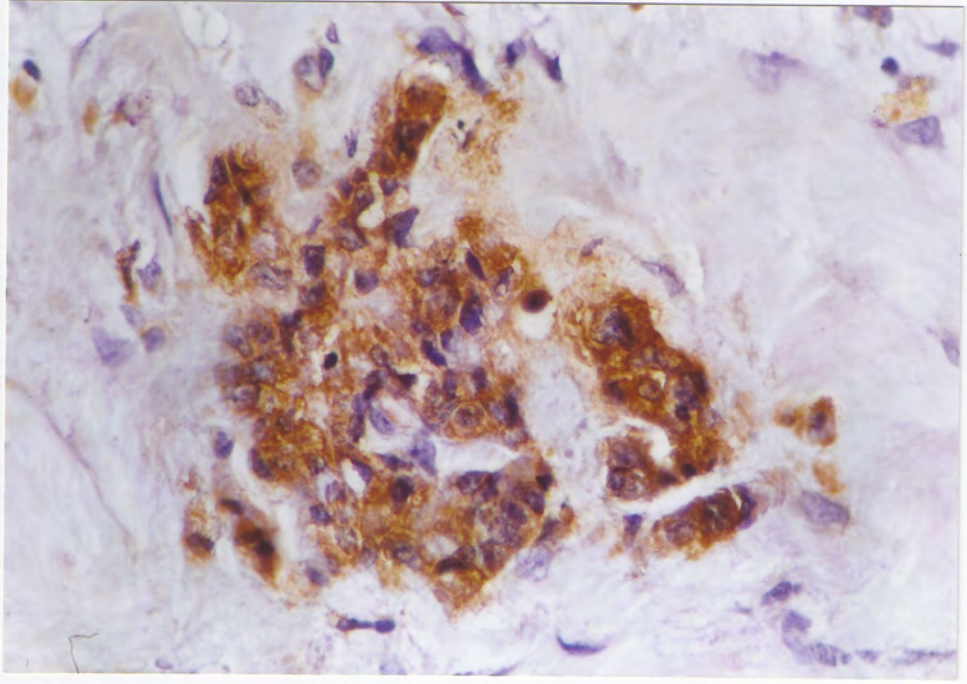
Resim 13: Aynı vaka; CEA; Diffüz +++ boyanma; 230x



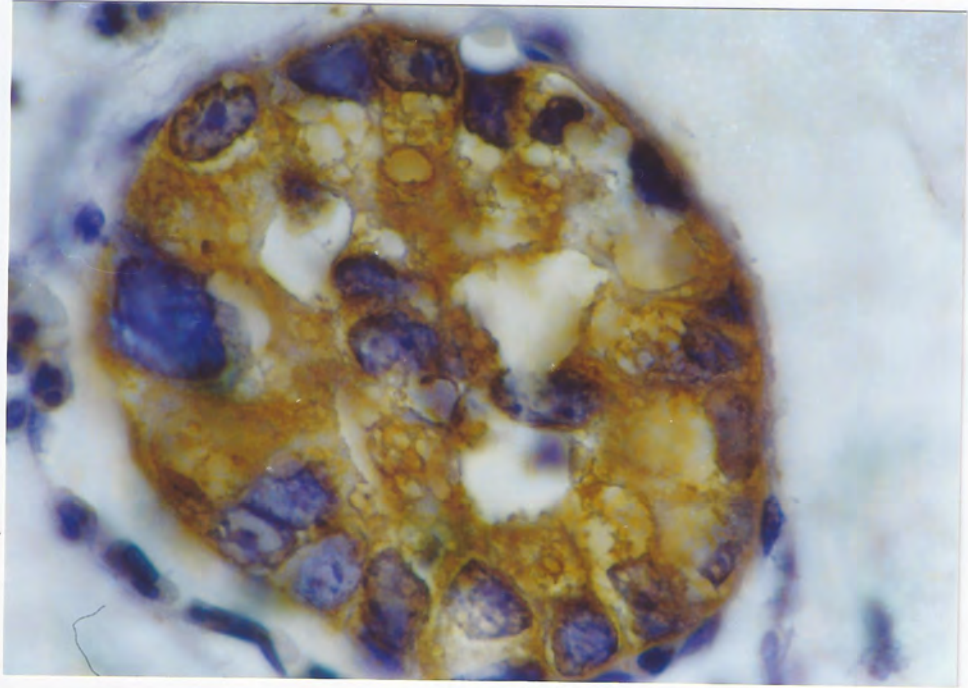
Resim 14: Grade III; CEA; Diffüz ++++ boyanma; 30x (Vaka No: 15; 534/1987) Dikkatle incelendiğinde üstte sağda kısmen korunmuş olarak görülen sağlam mukosa örneklerinde boyanmanın oldukça zayıf olduğu görülen ve tümör hücrelerinin doku derinliklerine doğru infiltrasyon olurken boyanma yoğunluklarının arttığı izlenmektedir.



Resim 15: Aynı vaka; CEA; Diffüz boyanma; 115x



Resim 16: Aynı vaka; CEA; Diffüz ++++ boyanma; 460x
Doku derinliklerinde yer yer tek tek, yer yer gruplar halinde izlenen tümör hücre infiltrasyonu



Resim 17: Aynı vaka; CEA; Diffüz ++++ boyanma; 1150x,
imm.oil.

TARTIŞMA

Serimizi oluşturan 15 primer safra kesesi adenokarsinomu vakasında saptadığımız kadın/erkek oranı, ortanca ve ortalama yaş değerleri 2.75; 60 ve 58.5, literatürde bildirilmiş değerler ile uyumludur (12,51,61,81,87).

Vakalarımızın Grade'lerine göre dağılımı incelendiğinde iyi (Grade I), orta (Grade II) ve az (Grade III) diferansiye adenokarsinom oranlarının sırasıyla % 46,6, % 26,6 ve % 26,6 olduğu görülmektedir. Bu değerler Nevin'in ileri sürdüğü görüşle uyummamaktadır. Yamaguchi ve Enjoji'nin bulguları ile uyum göstermektedir (51,87).

Birçok çalışmamızda kolorektal kanserli vakalarda plazma CEA düzeyi ile tümörlerin grade'leri arasında ilişki varlığı araştırılmış ancak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir (29,45). Buna karşın CEA immünohistokimyasal lokalizasyonu ve boyanma patterni ile tümör diferansiyasyonu arasında bağlantı kurulabilmektedir. Ancak bu konuda literatürdeki bilgiler çelişkilidir. Bazı otörler tarafından yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda, orta ve kötü diferansiye tümörlerde iyi diferansiye tümörlere oranla CEA, çok daha yoğun olarak saptanmıştır (29,40). Bu görüşün karşısında olan yazarlardan Masaki ve arkadaşları

ise kolorektal kanserlerde CEA kantitatif değerlerinin, iyi ve orta derecede diferansiye adenokarsinomlarda farklılık göstermediğini, bu iki histolojik tipte, kötü diferansiye tümörlere oranla 9 kat yüksek olduğunu belirtmişlerdir (1,39,69).

Bizim bulgularımıza göre Grade I ve II tümörler arasında CEA boyanma patterni açısından önemli bir fark görülmemektedir. Buna karşın Grade III az diferansiye adenokarsinomlarda izlenen yüksek diffüz boyanma karakteri Masaki ve arkadaşlarının görüşlerinin aksine diğer otörlerin bulguları ile uyumludur.

Safra kesesi doku CEA araştırmalarında immün peroksidaz metodların immün fluoresans metodlara üstünlüğü kanıtlanmıştır. De Boer ve arkadaşları ile Albores-Saavedra ve arkadaşları normal safra kesesi epitelinde CEA araştırmışlar; bu belirleyici immün peroksidaz yöntemler kullanan Albores-Saavedra ve grubu tarafından saptanmıştır(3).

Organın endodermden köken alması nedeniyle gastrointestinal sistemde bulunan birçok madde gibi Carcinoembryonic Antigen'in de safra kesesinde saptanabileceği öngörülmektedir (3,7,28,31,46). Albores-Saavedra ve arkadaşları normal epitel hücrelerinin, apikal sitoplazmalarında, muhtemelen glikokaliksler içinde dağılan az miktarda CEA içerdiklerini belirlemişlerdir. Ayrıca displazi vakalarından

invaziv karsinom vakalarına kadar CEA immünoreaktivite miktarının progresif olarak arttığını ve malign tümörlerde gland sekresyonlarında ve intrasitoplazmik kuvvetli CEA boyanması görüldüğünü bildirmişlerdir (3,5,6). Bu yazarlar serilerindeki adenokarsinom vakalarının tüm tiplerinde pozitif CEA reaksiyonu saptamışlar, buldukları dağılım patterninin kolonda lokalize benzer lezyonlarda görülen dağılım patternine benzerlik gösterdiğini ileri sürmüşlerdir (3).

Çalışmamızda tüm lezyonlarda pozitif boyandığı saptanan CEA in gerek dokuda gerekse hücre düzeyinde dağılım patterni ve lokalizasyonu Altoses-Saavedra ve arkadaşlarının bulgularıyla uyumludur.

Vakalarımızda preoperatif serum CEA ve HCG ölçümü yapıldığı konusunda bir veriye sahip olmadığımızdan çalışmamızda elde ettiğimiz boyanma patterni verileriyle serum değerleri ilişkisinin tartışılması mümkün olmamıştır.

Bazı yayınlarda CEA in non kanseröz dokularda ve non metaplastik safra kesesi ve mide mukozasında varlığı genetik olarak pluripotent bir CEA intestinal stem hücre varlığına bir kanıt olarak ileri sürülmektedir. Hücre gruplarının diferansiyasyonlarına göre değişen oranlarda CEA taşımaları mümkün görülmekte ve CEA in kanser spesifik değil, bir developmental belirleyici sistemi olarak düşünülebileceği belirtilmektedir (82,84).

Az diferansiye (Grade III) adenokarsinom vakalarımızdan birinde tümör dokusuna komşu epitelde zayıf bir CEA pozitif boyanması dikkati çekmektedir. Buna karşın muhozada sınırlı tümör hücreleri ile doku derinliklerine doğru infiltre olan tümör hücre gruplarında gittikçe artan yoğunlukta bir boyanma karakteri izlenmiştir. Bu bulgu developmental bir belirleyici sistemi varsayımına kanıt olabilir (Resim 14,15).

Özellikle Grade III tümörlerde tümör hücrelerinin davranış patterninin kesinlik kazanması örneğin damar ve/veya sinir invazyonlarının çok daha net olarak belirlenmesinde CEA immün boyanması yardımcı olabilir (Resim 8,10).

Safra kesesinde CEA lokalizasyonu bazı tümörlerin histogenezisinin anlaşılmasına da yardım edebilir (3,28). Örneğin karsinosarkomların epitelyal komponenti CEA ile boyanır ancak spindle hücreler ve heterolog dokular non epitelyal kökenleri dolayısıyla boya almazlar. Karsinosarkoma spindle hücrelerinin CEA içermeyen andiferansiye epitelyal hücreler oldukları ileri sürülebilirse de çok andiferansiye karsinomaların ve pleomorfik dev hücreli karsinomaların anaplastik hücrelerinde dahi CEA pozitif immünoreaktivitesi izlendiği bildirilmiştir (3).

Çalışmamızda vakalarımızın klinik özellikleri, ameliyat sırasındaki bulguları, uygulanan tedavi protokollerinin niteliği ve gerekleri konusundaki düşünceler ile

postoperatif takipleri ve prognozları hakkında bilgi edilemediğinden bu parametreler değerlendirilememiştir.

Kolorektal adenokarsinomalarda % 21.6 oranında ek-topik HCG yapımı saptanmış ve az diferansiye tümörlerde yapımın daha fazla olduğu gözlenmiştir (25,90).

Wittekind ve arkadaşları mide karsinomalarında % 34 oranında HCG pozitifliği saptamışlar; immün reaksiyonun genellikle tek tek hücre veya hücre gruplarında genellikle sitoplazmada, yer yer ise perinükleer ince granüler karakterde izlendiğini belirtmişlerdir (79). Ayrıca tümör grade'i ile antijen varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptayamamışlardır. Buldukları yüksek oranı her bir tümör dokusunun çeşitli alanlarından en az on örnek alınarak incelemelerine bağlamışlardır. Çeşitli histolojik tipler arasında HCG pozitifliği dağılım patterni değişiklik göstermemesine rağmen az diferansiye veya andiferansiye alanlarda yoğunluk kazanmaktadır (50,79).

Manabe, Adachi ve Hirao da normal, inflamatuvar ve karsinomatöz mide mukozasında HCG/HCG-beta immün reaktivitesini araştırmışlar; normal ve inflamatuvar dokuda pilor boynunda ve pseudopilorik glandlarda; antrum, pilor ve kardialda lokalize karsinomlarda intrasitoplazmik diffüz, üniform, granüler bir formasyonda izlemişlerdir. İlerlemiş ve erken mide kanseri vakaları arasında boyanma patterninde farklılık saptayamamışlardır. Bununla beraber az

diferansiye adenokarsinom vakalarında diğ er histolojik tiplere oranla daha yoğun bir boyanma gözlemişlerdir (44,50).

Nonomura ve arkadaşları 44 kolangiokarsinom vakasında % 23 oranında HCG immünoreaktivitesi saptamıştır (53). HCG pozitif alanlar genellikle tümörlerin az diferansiye veya andiferansiye bölgelerindedir (35,53).

Safra kesesi karsinomalarının yaklaşık %10 unu oluşturan andiferansiye (anaplastik) karsinomalarda Guo, Yamaguchi ve Enjoji HCG immünoreaktivitesini 19 vakada % 47 olarak saptamışlardır(28).

Çalışmamızda saptadığımız HCG immünoreaktivitesi 5 vakada (% 33.3) izlenmiştir. Bulgularımıza göre Grade I ve II tümörler arasında boyanma patterni açısından önemli bir fark görülmemektedir. Buna karşın Grade III tümörde diffüz boyanma saptanmıştır. Bu bulgu da, Nonomura ve arkadaşları (53) ile Guo, Yamaguchi ve Enjoji (28)'nin bulguları ile ve Wittekind ve arkadaşları (79) ile Manabe, Adachi ve Hirao (44)'nun mide karsinomları serilerindeki ve diğ er yazarların kolorektal karsinomlardaki (25) bulgularıyla uyum göstermektedir.

Çalışmamızda araştırdığımız her iki belirleyici de çeşitli araştırmacılar tarafından diğ er sistem organ ve lezyonlarında olduğu gibi gastrointestinal sistem normal, preneoplastik ve neoplastik dokularında aynı çalışmalar içerisinde incelenmiştir. Ancak varlıkları ve dağılım patternleri ayrı ayrı değerlendirilmiş, birlikte pozitif

immünoreaktivitelerinin fonksiyonel ve/veya biyolojik anlamı üzerinde bir yorum yapılmamıştır. Serimizdeki vaka sayısının yeterli olmaması bizim de bir yorum geliştirmemizi engellemektedir. Ancak 5 vakada birlikte pozitif olduklarını izlediğimiz CEA ve HCG in 4 vakada fokal boyanma karakteri göstermeleri ilgi çekmektedir. Ayrıca HCG pozitif reaksiyonu izlenen vakalardan 4 ünün kadın olduğu (% 80) da bir diğer dikkat çekici nokta olmaktadır.

Vaitukaitis ve arkadaşları 1976 da bildirdikleri 73 vakalık mide karsinomları serilerinde RIA yöntemi kullanılarak vakaların % 22 sinde yüksek serum HCG değerleri saptamışlardır (34,47). Kodama ve arkadaşları da 1981 de mide karsinomalarında bu oranı % 26 olarak belirtmişlerdir (10,47). Bununla beraber mide karsinomalarında saptanan HCG; biyolojik aktivite açısından placentel HCG nin gösterdiği, jinekomasti, Leydig hücre hiperplazisi veya endometrial hiperplazi gibi klinik bulgulara yol açmayan bir farklılığa sahiptir (24,47). Yoshimoto ve arkadaşları 1979 da non-placentel karsinomalarda salgılanan HCG in karbohidrat komponentinin placentel HCG ye göre daha az olduğunu ve çeşitli malign tümörlerde saptanan HCG karbohidrat komponentlerinin de farklı olduğunu; Hattori, Tahara ve arkadaşları da non-plasental malign tümörlerin dengesiz bir HCG subunit yapımı gösterdiklerini bildirmişlerdir (47,50).

İnsan HCG-alfa subuniti bir gen tarafından kontrol edilir, buna karşın beta subuniti yapımı ise en az iki kromozom üzerinde yerleşmiş sekiz veya daha fazla ayrı gen tarafından düzenlenir (34). Tümör hücrelerinin özellikle beta-HCG subuniti yapımını nasıl gerçekleştirdikleri kompleks genomik düzenleme nedeniyle bilinmemektedir (34,64).

Tahara ve arkadaşlarının bildirdikleri trofoblast içermeyen mide karsinomlarında, iyi diferansiye olanlara oranla az diferansiye tümörlerde çok daha fazla polipeptid hormon, aminler ve HCG yapımı saptanmıştır (47,50). Okano 1979 da histolojik diferansiyasyonun, ektopik yapım için tümörün kökeninden daha önemli olduğunu ileri sürmüştür. Nakanuma ve arkadaşları da bu düşünceyi desteklemektedirler (50). Bu düşünceler ışığında polipeptid, HCG veya proteinlerin ektopik yapımı DNA ile kodlanmış durumdadır ve erişkin organlarında suprese durumdadır. Tümör hücrelerinin primitif germ hücrelerine doğru anormal diferansiyasyonlarının derepresyona neden olduğu ve HCG yapımının başladığı ileri sürülmektedir (47,50,64).

Bununla beraber trofoblast içermeyen ekstragonadal tümörlerde hücresele düzeyde HCG ekspresyonunu etkileyen çok çeşitli kontrol faktörleri olabilir (34,47,50,64).

Manabe, Adachi ve Hirao da HCG yapımının normal ve regenerasyon gösteren dokularda bulunmasının aktif proliferasyon gösteren hücrelerin fizyolojik bir karakteri

olduğunu, aktif prolifere kanser hücrelerinin de benzer biyolojik karakterleri olabileceğini ileri sürmüşlerdir(44).

Non trofoblastik hücrelerdeki HCG yapımının fonksiyonel önemini açıklamak için daha ileri çalışmalara gerek duyulduğu görülmektedir.

Son birkaç yıl öncesine kadar sadece araştırma amacı ile kullanılan tümör belirleyicilerine karşı geliştirilen primer antiseralar ve immünohistokimya metodlarının gelişmesi; sonuçları etkileyen parametrelerin tek tek ortaya çıkarılıp kontrol edilebilmesi, elde edilen bilgilerin gün geçtikçe artması ve çalışma pratiğinde gözlenen yararlılık ve kullanışlılık nedeni ile yavaş yavaş tanı amacıyla kullanılan rutin teknikler arasına girmeye başlamalarına imkan sağlamıştır. "College of American Pathologists" hücre belirleyicileri komitesi, 1986-1988 döneminde Amerika'da immünopatoloji merkezlerinde tanısal amaçla uygulanan CEA immün boyanma objektif performans oranını % 91, subjektif tanısal değer oranını % 76 olarak saptamışlardır. HCG için bu oranlar sırasıyla % 82 ve % 85 olarak bildirilmiştir (80).

Tümör belirleyicileri hakkında öğrenilecek her yeni bilgi tümörlerin etiolojisine, histogenezine ve biyolojilerine normal dokular ile aralarındaki ilişkilerine bizi daha çok yaklaştıracak ve belki de birgün tümörlerin

eradikasyonunda önemli rol oynayabilecek bir ipucunu bize kazandıracaktır.

Bu amaçla daha çok çalışma yapılması gerektiğine inanmaktayız.

SONUÇ

1- Bu çalışmanın temelini 1976-1990 yılları arasında SB Ankara Hastanesi Patoloji Laboratuvarı'nda primer safra kesesi adenokarsinomu tanısı almış 15 lezyon oluşturmaktadır.

2- Serimizde ortanca ve ortalama yaş; sırasıyla 60 ve 58.5; kadın/erkek oranı 2.75 dir.

3- 7 vaka Grade I, 4 vaka Grade II ve 4 vaka da Grade III grubunda sınıflandırılmıştır.

4- İmmünohistokimya boyama metodu olarak 1981 yılında Hsu ve Raine'in önerdikleri avidin-biotin-peroksidaz kompleksi metodu ile çalışılmıştır.

5- Serimizdeki vakaların hepsinde (% 100) tümör hücreleri yüzeyinde, sitoplazmalarında ve gland sekresyonlarında CEA koyu kahverengi granüler bir formasyonda pozitif reaksiyon göstermiştir.

6- CEA boyanma patterni dağılımı Grade I ve II tümörlerin hepsinde fokal nitelikte, Grade III tümörlerde ise % 75 oranında diffüz karakterdedir. Bu özellik, diğer gastrointestinal kaynaklı adenokarsinomalardaki dağılım patterni ile benzerlik göstermektedir.

7- 5 vakada (% 33.3) tümör hücreleri yüzeyinde yer yer zayıf, yer yer kuvvetli ve intrasitoplazmik uniform, diffüz, koyu kahverengi granüler tarzda HCG immünoreaktivitesi izlenmiştir.

8- HCG boyanma patterni dağılımı Grade I ve II tümörlerde fokal nitelikte, Grade III tümörde ise diffüz karakterdedir. Bu durum, özellikle mide ve kolorektal adenokarsinomlarda izlenen boyanma patterni ile uyumludur.

9- Her iki belirleyici 5 vakada birlikte pozitif boyanma göstermişlerdir. Bu vakalardan 4 ünde fokal boyanma patterni izlenmiştir.

10- İmmünohistokimyasal metodlar bugün için tek başlarına tanı amacıyla kullanılamamaktadırlar. Histolojik ve sitolojik bulgular ve klinik veriler yanında ek ve destekleyici bir rolleri vardır. Ancak her geçen gün tanısal uygulamalar giderek gelişmekte ve hızla rutin teknikler arasına katılma eğilimi göstermektedirler.

11- Primer safra kesesi adenokarsinomlarında tümör belirleyicileri CEA ve HCG nin varlığı ile dağılım patterni ve tümör grade'i ile olan ilişkisinin araştırıldığı bu tez bir ön çalışma niteliğinde olup, bunu izleyen çalışmalarımızda,

- Mevcut vaka sayımızı artırarak verilerimizi çoğaltmayı ve istatistiksel yoruma uygun hale getirmeyi,

- Daha geniş ve klinikopatolojik verileri yeterli bir seride serum ve gerçekleştirilebilirse safra monoklonal belirleyici değerleri ile tümör stage ve grade özelliklerini araştırmayı,

- Özellikle HCG in normal, inflamatuvar ve preneoplastik safra kesesi epitelinde ekspresyonunun olup olmadığını incelemeyi amaçlıyoruz.

Ö Z E T

Bu tezde S.B. Ankara Hastanesi Patoloji Laboratuvarı'nda 1976-1990 yılları arasında primer safra kesesi adenokarsinomu tanısı almış 15 lezyon üzerinde çalışılmıştır. Yeniden incelenerek diferansiyasyonlarına göre sınıflandırılan tümörlerde, Carcinoembryonic Antigen ve Human Chorionic Gonadotropin varlığı ve tümör grade'leri ile olan ilişkileri araştırılmıştır.

Tüm vakalarda CEA pozitif bulunmuştur. Boyanma yoğunluğu az diferansiye (Grade III) adenokarsinom vakalarında daha fazladır. HCG immünoreaktivitesi % 33.3 vakada izlenmiş ve boyanma yoğunluğu CEA ile benzerlik göstermiştir.

CEA ile HCG in primer safra kesesi adenokarsinomlarında saptadığımız boyanma özellikleri ve dağılım patternleri bu belirleyicilerin diğer gastrointestinal sistem adenokarsinomlarında gözlenen boyanma özellikleri ve dağılım patternleri ile uyumludur.

SUMMARY

Fifteen primary gallbladder carcinomas diagnosed between 1976-1990 at the Pathology Laboratories of S.B. Ankara Hospital were studied for the expression of carcinoembryonic antigen (CEA) and human chorionic gonadotropin (HCG). Histologic sections were reviewed and the tumors were graded. Representative sections were stained for CEA and HCG using an avidin biotin complex immunoperoxidase technique.

All 15 tumors showed positivity for CEA. The intensity of the staining was stronger and more extensive in undifferentiated carcinomas. HCG was positive in 33.3 % of the tumors and the pattern of staining was similar to that of CEA.

Our findings show that the presence and the pattern of distribution of CEA and HCG in primary gallbladder carcinomas closely resemble that in other gastrointestinal carcinomas.

KAYNAKLAR

- 1- Ahnen DJ, Nakane PK, Brown WR. Ultrastructural Localisation of Carcinoembryonic Antigen in Normal Intestine and Colon Cancer: Abnormal Distribution of CEA on the Surfaces of Colon Cancer Cells. *Cancer* 1982; 49: 2077-2090.
- 2- Akiyama H, Yamamoto M, Sumiyoshi H, et al. Carcinoembryonic Antigen (CEA) in Gallbladder Bile and Mucosa in Cholecystolithiasis. *Acta Chir Scand* 1986; 152: 509-513.
- 3- Alboves-Saavedra J, Nadjı M, Morales AR, et al. Carcinoembryonic Antigen in Normal, Preneoplastic and Neoplastic Gallbladder Epithelium, *Cancer* 1983; 52: 1069-1072.
- 4- Albores-Saavedra J, Soriano J, Larraza-Hernandez O, et al. Oat Cell Carcinoma of the gallbladder. *Human Pathology*. 1984; 15(7): 639-646.
- 5- Albores-Saavedra J, Nadjı M, Hanson DE, et al. Intestinal Metaplasia of the Gallbladder: A Morphologic and Immunocytochemical Study. *Human Pathology* 1986; 17(6): 614-620.
- 6- Albores-Saavedra J, Angeles-Angeles A, Manrique JJ, et al. Carcinoma in situ of the Gallbladder: A Clinicopathologic study of 18 cases. *Am J Surg. Pathol* 1984; 8(5): 323-333.
- 7- Aroni K, Kittas C, Papadimitriou CS, et al. An immunocytochemical study of the distribution of Lysozyme, α_1 -antitrypsin and α_1 -antichymotrypsin in the normal and pathological gall bladder. *Virchows Arch [Pathol Anat]* 1984; 403: 281-289.
- 8- Au F, Stein BS, Gennaro AR, et al. Tissue CEA in Colorectal Carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1984; 27: 16-18.
- 9- Bivins BA, Meeker WR, Griffen WO. Importance of Histologic Classification of Carcinoma of the Gallbladder. *The American Surgeon* 1975; 41(3): 121-124.

- 10- Bellet D, Arrang JM, Contesso G, et al. Localisation of the β Subunit of Human Chorionic Gonadotropin on Various Tumors. *Europ.J. Cancer* 1980; 16: 433-439.
- 11- Bosman FT, Kruseman ACN. Clinical Applications of the Enzyme Labeled Antibody Method: Immunoperoxidase Methods in Diagnostic Histopathology. *J.Histochem Cytochem* 1979; 27(8): 1140-1147.
- 12- Bosset JF, Mantion G, Gillet M, et al. Primary Carcinoma of the Gallbladder: Adjuvant Postoperative External Irradiation. *Cancer* 1989; 64: 1843-1847.
- 13- Braunstein GD, Mc Intire KR, Waldmann TA. Discordance of Human Chorionic Gonadotropin and Alpha-Fetoprotein in Testicular Teratocarcinomas. *Cancer* 1973; 31: 1065-1068.
- 14- Burg-Kurland CL, Purnell DM, Combs JW, et al. Immunocytochemical Evaluation of Human Esophageal Neoplasms and Preneoplastic Lesions for β -Chorionic Gonadotropin, Placental Lactogen, α -Fetoprotein, Carcinoembryonic Antigen, and Nonspecific Cross-Reacting Antigen. *Cancer Research* 1986; 46: 2936-2943.
- 15- Civantos F, Rywlin AM. Carcinomas with Trophoblastic Differentiation and Secretion of Chorionic Gonadotropins. *Cancer* 1972; 29: 789-798.
- 16- Concannon JP, Dalbow MH, Frich JC. Carcinoembryonic Antigen (CEA) Plasma Levels in Untreated Cancer Patients and Patients with Metastatic Disease. *Radiology* 1973; 108: 191-193.
- 17- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL (Eds). *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 4th ed. Philadelphia, 1989, W.B. Saunders Co.
- 18- De Lellis RA, Sternberger LA, Mann RB, et al. Immunoperoxidase Technics in Diagnostic Pathology: Report of a Workshop Sponsored by the National Cancer Institute *Am.J.Clinical Pathol* 1979; 71(5): 483-488.
- 19- Delwiche R, Zamcheck N, Marcon N. Carcinoembryonic Antigen in Pancreatitis, *Cancer* 1973; 31: 328-330.

- 20- Dowling GP, Kelly JK. The Histogenesis of Adenocarcinoma of the Gallbladder. *Cancer* 1986; 58: 1702-1708.
- 21- Falini B, Taylor CR. New Developments in Immunoperoxidase Techniques and Their Application. *Arch Pathol Lab Med* 1983; 107; 105-117.
- 22- Fletcher RH. Carcinoembryonic Antigen. *Ann. Intern Med* 1986; 104: 66-73.
- 23- Frierson HF. The Gross Anatomy and Histology of the Gallbladder, Extrahepatic Bile Ducts, Vaterian System, and Minor Papilla. *Am J Surg Pathol* 1989; 13(2) 146-162.
- 24- Fukayama M, Hayashi Y, Koike M. Human Chorionic gonadotropin in gastric carcinoma: An immunohistochemical study suggesting independent regulation of subunits. *Virchows Arch (A)* 1987; 411(3): 205-212.
- 25- Gailani S, Chu TM, Nussbaum A, et al. Human Chorionic Gonadotropins (hCG) in Non-Trophoblastic Neoplasms: Assessment of Abnormalities of hCG and CEA in Bronchogenic and Digestive Neoplasms. *Cancer* 1976; 38: 1684-1686.
- 26- Gold P, Shuster J. Historical Development and Potential Uses of Tumor Antigens as Markers of Human Cancer Growth. *Cancer Reseach* 1980; 40: 2973-2976.
- 27- Goldenberg DM, Sharkey RM, Primus FJ. Immunoscytochemical Detection of Carcinoembryonic Antigen in Conventional Histopathology Specimens. *Cancer* 1978; 42: 1546-1553.
- 28- Guo KJ, Yamaguchi K, Enjoji M. Undifferentiated Carcinoma of the Gallbladder: A Clinicopathologic, Histochemical, and Immunohistochemical Study of 21 Patients With a Poor Prognosis. *Cancer* 1988; 61: 1872-1879.
- 29- Hamada Y, Yamamura M, Hioki K, et al. Immunohistochemical Study of Carcinoembryonic Antigen in Patients With Colorectal Cancer. *Cancer* 1985; 55: 136-141.
- 30- Hamasaki K, Ueda H, Okamura Y, et al. Double Immunoelectron microscopic labelings of human chorionic gonadotropin and human placental lactogen in human chorionic villi. *Sangyo Ika Daigaku Zasshi* 1988; 10(2): 171-177 (Abstract).

- 31- Harmenberg U, Wahren B, Wiechel KL. Tumor Markers Carbohydrate Antigens CA 19-9 and CA-50 and Carcinoembryonic Antigen in Pancreatic Cancer and Benign Diseases of the Pancreatobiliary Tract. *Cancer Research* 1988; 48: 1985-1988.
- 32- Hautzer NW, Wittkuhn JF, McCaughey WT. Trypsin Digestion in Immunoperoxidase Staining. *J Histochem Cytochem* 1980; 28(1): 52-53.
- 33- Haynes WDG, Shertock KL, Skinner JM, et al. The ultrastructural immunohistochemistry of oncofoetal antigens in large bowel carcinomas. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 1985; 405: 263-275.
- 34- Heitz PU, Herbay G, Klöppel G, et al. The Expression of Subunits of Human Chorionic Gonadotropin (hCG) by Nontrophoblastic, Nonendocrine and Endocrine Tumors. *Am J Clin Pathol* 1987; 88(4): 467-472.
- 35- Heyderman E, Chapman DU, Richardson TC, et al. Human Chorionic Gonadotropin and Human Placental Lactogen in Extragonadal Tumors: An Immunoperoxidase Study of Ten Non-Germ Cell Neoplasms. *Cancer* 1985; 56: 2674-2682.
- 36- Heyderman E. Immunoperoxidase technique in histopathology: applications, methods, and controls. *J Clin Pathol* 1979; 32: 771-978.
- 37- Hsu SM, Raine L, Fanger H. The Use of Antiavidin Antibody and Avidin-Biotin-Peroxidase Complex in Immunoperoxidase Technics. *Am J Clin Pathol* 1981; 75(6): 816-821.
- 38- Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: A comparison between ABC and Unlabeled Antibody(PAP) Procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29(4): 577-580.
- 39- Huitric E, Laumonier R, Burtin P, et al. An Optical and Ultrastructural Study of the Localisation of Carcinoembryonic Antigen (CEA) in Normal and Cancerous Human Rectocolonic Mucosa. *Laboratory Investigation* 1976; 34(1): 97-107.
- 40- Isaacson P, Le Vann HP. The Demonstration of Carcinoembryonic Antigen in Colorectal Carcinoma and Colonic Polyps Using An Immunoperoxidase Technique. *Cancer* 1976; 38: 1348-1356.

- 41- Jothy S, Brazinsky SA, Chin-A-Loy M, et al. Characterization of Monoclonal Antibodies to Carcinoembryonic Antigen with Increased Tumor Specificity. *Lab. Invest* 1986; 54(1): 108-117.
- 42- Kimura W, Nagai H, Kuroda A, et al. Clinicopathologic Study of Asymptomatic Gallbladder Carcinoma Found at Autopsy. *Cancer* 1989; 64: 98-103.
- 43- Kleist SU. Diagnostic Significance of Tumor Markers. *Cancer Research* 1980; 40: 2977-2978.
- 44- Manabe T, Adachi M, Hirao K. Human Chorionic Gonadotropin in Normal, Inflammatory, and Carcinomatous Gastric Tissue. *Gastroenterology* 1985; 89: 1319-1325.
- 45- Midiri G, Amanti C, Benedetti M, et al. CEA Tissue Staining in Colorectal Cancer Patients: A Way to Improve the Usefulness of Serial Serum CEA Evaluation. *Cancer* 1985; 55: 2624-2629.
- 46- Moore KL. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. 4th ed. Philadelphia, 1988, W.B. Saunders Co.
- 47- Mori H, Soeda O, Kamano T, et al. Choriocarcinomatous Change With Immunocytochemically HCG-Positive Cells in the Gastric Carcinoma of the Males. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 1982; 396: 141-153.
- 48- Nagell JR, Donaldson ES, Gay EC, et al. Carcinoembryonic Antigen in Carcinoma of the Uterine Cervix: Tissue Localisation and Correlation with Plasma Antigen Concentration. *Cancer* 1979; 44: 944-948.
- 49- Nakane PK, Watanabe T. Distribution of Oucodevelopmental Markers in Neoplastic Cells: Therapeutic Implications. *J Histochem Cytochem* 1984; 32(8): 894-898.
- 50- Nakanuma Y, Unoura M, Noto H, et al. Human Chorionic ganadotropin in primary liver carcinoma in adults: An immunohistochemical study. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 1986; 409: 365-373.
- 51- Nevin JE, Moran TJ, Kay S., et al. Carcinoma of the Gallbladder: Staging, Treatment, and Prognosis. *Cancer* 1976; 37: 141-148.

- 52- Niehans GA, Maniyel JC, Copland GT, et al. Immunohistochemistry of germ cell and trophoblastic neoplasms. *Cancer* 1988; 62(6): 1113-1123.
- 53- Nonomura A, Mizukami Y, Matsubara F, et al. Human chorionic gonadotropin and alpha-fetoprotein in cholangiocarcinoma in relation to the expression of ras p 21: an immunohistochemical study. *Liver* 1989; 9(4): 205-215.
- 54- Ona FV, Zamcheck N, Dhar P, et al. Carcinoembryonic Antigen (CEA) in the Diagnosis of Pancreatic Cancer. *Cancer* 1973; 31: 324-327.
- 55- Ordonez NG, Manning JT, Brooks TE. Effect of Trypsinization on the Immunostaining of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *Am J Surg Pathol* 1988; 12(2): 121-129.
- 56- Ordonez NG, Ayala AG, Kaymond AK, et al. Ectopic production of the beta-subunit of human chorionic gonadotropin in osteosarcoma. *Arch Pathol Lab Med.* 1989; 113(4): 416-419.
- 57- Penneys NS, Nadji M, Ziegels-Weissman J, et al. Carcinoembryonic Antigen in Sweat-Gland Carcinomas. *Cancer* 1982; 50: 1608-1611.
- 58- Pettigrew NM. Techniques in Immunocytochemistry. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 641-644.
- 59- Pinkus GS. Diagnostic Immunocytochemistry of Paraffin-Embedded Tissues. *Human Pathology* 1982; 13(5): 411-415.
- 60- Rickert RR, Maliniak RM. Intralaboratory Quality Assurance of Immunohistochemical Procedures. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 673-679.
- 61- Rosai J. (Ed.) *Ackerman's Surgical Pathology*, 7th ed, St. Louis, 1989, The C.V. Mosby Co.
- 62- Ruacan Ş.A. Kişisel görüşme, 1989-1990.
- 63- Sato H, Mizushima M, Ito J, et al. Sessile Adenoma of the Gallbladder: Reappraisal of Its Importance as a Precancerous Lesion. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109: 65-69.

- 64- Siler-Khodr TM, Khodr GS, Valenzuela G, et al. Gonadotropin-releasing Hormone Effects on Placental Hormones during Gestation: I. Alpha-Human Chorionic Gonadotropin, Human Chorionic Gonadotropin and Human Chorionic Somatomotropin. *Biology of Reproduction* 1986; 34: 245-254.
- 65- Sons HU, Borchard F, Joel BS. Carcinoma of the Gallbladder: Autopsy Findings in 287 Cases and Review of the Literature. *J Surg Oncol* 1985; 28: 199-206.
- 66- Sugaya Y, Sugaya H, Kuronuma Y, et al. A case of gallbladder carcinoma producing both alpha-fetoprotein (AFP) and carcinoembryonic antigen (CEA). *Gastroenterol Jpn* 1989; 24(3): 325-31.
- 67- Sun NCJ, Edgington TD, Carpentier CL, et al. Immunohistochemical Localisation of Carcinoembryonic Antigen (CEA), CEA-S, and Nonspecific Cross-Reacting Antigen (NCA) in Carcinomas of Lung. *Cancer* 1983; 52: 1632-1641.
- 68- Suster S, Huszar M, Herczeg E, et al. Adenosquamous carcinoma of the gallbladder with spindle cell features. A light microscopic and immunocytochemical study of a case. *Histopathology* 1987; 11: 209-214.
- 69- Quentmeier A, Möller P, Schwarz V, et al. Carcinoembryonic Antigen, CA 19-9, and CA 125 in Normal and Carcinomatous Human Colorectal Tissue. *Cancer* 1987; 60: 2261-2266.
- 70- Taylor CR, Bennington JL (eds.) *Immunomicroscopy: A Diagnostic Toll for the Surgical Pathologists*. WB Saunders Co, Philadelphia, 1986.
- 71- Taylor CR, *Immunoperoxidase Techniques: Practical and Theoretical Aspects*. *Arch Pathol Lab Med* 1978; 102: 113-121.
- 72- Taylor CR, Kledzig K. *Immunohistologic Techniques in Surgical Pathology-A Spectrum of "New" Special Stains*. *Human Pathology* 1981; 12(7): 590-596.
- 73- Tormey DC, Waalkes TP, Ahmann D, et al. *Biological Markers in Breast Carcinoma: Incidence of Abnormalities of CEA, HCG, Three Polyamines, and Three Nucleosides*. *Cancer* 1975; 35: 1095-1100.

- 74- Tsutsumi Y, Nagura H, Watanabe K. Immunohistochemical Observations of Carcinoembryonic Antigen (CEA) and CEA-related Substances in Normal and Neoplastic Pancreas. *Am J Clin Pathol* 1984; 82(5): 535-542.
- 75- Tuncer İ. Patoloji'de Tümör Markerleri. Önal B (ed.) VIII. Ulusal Patoloji Kongresi ve Patoloji Simpozyumu Kitabı, Cilt II, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1989; 1291-1299.
- 76- Wagener C, Petzold P, Köhler W, et al. Binding of Five Monoclonal Anti-CEA Antibodies with Different Epitope Specificities to Various Carcinoma Tissues. *Int J Cancer* 1984; 33: 469-475.
- 77- Walker RA. Demonstration of Carcinoembryonic Antigen in Human Breast Carcinomas by the Immunoperoxidase Technique. *J Clin Pathol* 1980; 33: 356-360.
- 78- Wilson TS, Mc Dowell EM, Mc Intire KR, et al. Elaboration of Human Chorionic Gonadotropin by Lung Tumors. *Arch Pathol Lab Med* 1981; 105: 169-173.
- 79- Wittekind C, Wachner R, Henke W, et al. Localisation of CEA, HCG, Lysozyme, alpha-1-antitrypsin, and alpha-1-antichymotrypsin in gastric cancer and prognosis. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 1986; 409: 715-724.
- 80- Wold LE, Corwin DJ, Rickert RR. Interlaboratory Variability of Immunohistochemical Stains: Results of the Cell Markers Survey of the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 680-683.
- 81- Wright JC. Update in Cancer Chemotherapy: Gastrointestinal Cancer, Cancer of the Small Intestines, Gallbladder, Liver, and Esophagus. *J National Med Assoc* 1986; 78(8): 753-766.
- 82- Wurster K, Rapp W. Histological and Immunohistological Studies on Gastric Mucosa: I. The Presence of CEA in Dysplastic Surface Epithelium. *Path Res Pract* 1979; 164: 270-281.
- 83- Yagel S, Casper RF, Powell W, et al. Characterization of pure human first trimester cytotrophoblast cells in long-term culture: growth pattern markers, and hormon production. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 160(4): 938-945.
- 84- Yamagiwa H. Dysplasia of Gallbladder: Its Pathological Significance. *Acta Pathol Jpn* 1987; 37(5): 747-754.

- 85- Yamagiwa H, Tomiyama H. Intestinal Metaplasia-Dysplasia-Carcinoma Sequence of the Gallbladder. Acta Pathol Jpn 1986; 36(7): 989-997.
- 86- Yamaguchi A, Ishida T, Nishimura G, et al. Human chorionic gonadotropin in colorectal cancer and its relationship to prognosis. British J Cancer 1989; 60(3): 382-384.
- 87- Yamaguchi K, Enjoji M. Carcinoma of the Gallbladder: A Clinicopathology of 103 Patients and a Newly Proposed Staging. Cancer 1988; 62: 1425-1432.
- 88- Yamamoto M, Nakajo S, Tahara E. Histological Classification of Epithelial Polypoid Lesions of the Gallbladder. Acta Pathol Jpn 1988; 38(2): 181-192.
- 89- Yamamoto M, Nakajo S, Tahara E. Histogenesis of Well-differentiated Adenocarcinoma of the Gallbladder. Path Res Pract 1989; 184: 279-286.
- 90- Yamase HT, Wurzel RS, Nieh PT, et al. Immunohistochemical Demonstration of Human Chorionic Gonadotropin in Tumors of the Urinary Bladder. Ann Clin Lab Science 1985; 13(5): 414-417.
- 91- Yeatman TJ, Bland KI, Copeland III EM, et al. Relationship Between Colorectal Liver Metastases and CEA Levels in Gallbladder Bile. Ann Surg 1989; 210(4): 505-512.