

Peritoneal yıkama sıvısında malign hücre bulunan mide adenokarsinomlarında, tümöral dokuda üç tümör belirleyicisinin (CEA, CA19-9, nm-23) incelenmesi

Evaluation of three tumor markers (CEA, CA19-9, nm-23) in tumor tissues of patients with gastric adenocarcinoma showing positive peritoneal lavage solution for malignant cells

Hülya Akgün,

Asst. Prof. Dr., MD.
Department of Patology,
Erciyes University Faculty of Medicine,
hulyaakgun@yahoo.com

Işın Soyuer,

Assoc. Prof. Dr., MD.
Department of Patology,
Erciyes University Faculty of Medicine,
isinsoy@erciyes.edu.tr

Fatma Tokat,

Dr., MD.
Department of Patology,
Erciyes University Faculty of Medicine,
drftokat@hotmail.com

Mehmet Aslan,

Dr., MD.
Department of General Surgery,
Erciyes University Faculty of Medicine,

Mustafa Kula,

Assoc. Prof. Dr., MD.
Department of Nuclear Medicine,
Erciyes University Faculty of Medicine,
mkula@erciyes.edu.tr

This study was presented in the XVIII. Pathology Symposium, 7-11 May, 2006, Çeşme, Muğla, Turkey.

This manuscript can be downloaded from the webpage:
[http://tipdergisi.erciyes.edu.tr/download/2007;29\(1\):007-012.pdf](http://tipdergisi.erciyes.edu.tr/download/2007;29(1):007-012.pdf)

Submitted : May 30, 2006
Revised : July 12, 2006
Accepted : January 29, 2007

Corresponding Author:

Hülya Akgün
Department of Patology,
Erciyes University Faculty of Medicine,
38280, Kayseri/Turkey

Telephone : +90 352 4374937 - 24059
E-mail : hulyaakgun@yahoo.com

Özet

Amaç: Serozaya invaziv mide adenokarsinomlarının yaklaşık yarısı, küratif rezeksiyon uygulanmış olmasına rağmen, peritoneal rekürrens gelişimi ile ilk iki yıl içerisinde kaybedilmektedir. Serozal invazyon bulunmaksızın peritoneal yıkama sıvısı (PYS) pozitif olan hastalarda yine peritoneal nüksler karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmanın amacı mide adenokarsinomu nedeni ile opere edilen 31 hastada intraoperatif elde edilen PYS ile spesmenin CEA, CA19-9 ve nm23 ile immunohistokimyasal boyanması ve operasyon öncesi ölçülen serum CEA, CA19-9 ve operasyon sırasında ölçülen portal vendeki CEA, CA19-9 seviyeleri arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır.

Hastalar ve Yöntem: Mide adenokarsinomu nedeni ile 2001 yılı içerisinde opere olan hastalara (31 olgu); operasyon sırasında, laparotomiden hemen sonra peritoneal yıkama yapılarak elde edilen sıvıda sitolojik olarak atipik hücre araştırıldı. Kandaki CEA, CA19-9 seviyelerini belirlemek için operasyondan önce sistemik kan ve operasyon sırasında portal kan örnekleri alındı. Operasyon spesmenleri incelenerek CEA, CA19-9 ve nm23 ile immunohistokimyasal boyanma uygulandı. Bulguların değerlendirilmesinde Ki-kare istatistik yöntemi kullanıldı.

Sonuç: Olguların 16'sı diffüz 15'i ise intestinal tip adenokarsinom tanısı aldı. Serozal invazyon 24 hastada bulunurken bu hastaların yalnızca 6'sında PYS'de pozitiflik bulundu. Serozal invazyon olmaksızın PYS'de pozitiflik bulunan hastamız mevcut değildi. PYS pozitif hastaların 3'ü intestinal diğer 3'ü ise diffüz tipteydi. Sitoloji pozitifliği ve CEA, CA19-9 ve nm23 ile immunohistokimyasal boyanma oranı arasında ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına rağmen ($p>0,05$), sistemik kanda yüksek bulunan CEA ve CA19-9 seviyesi ile portal kandaki CEA yüksekliği ile PYS pozitifliği arasındaki anlamlı istatistiksel ilişki vardı ($p<0,05$).

Tartışma: PYS'de malign hücre varlığının araştırılmasında sitolojik inceleme basit, ucuz ve hızlı bir yöntemdir. Bununla birlikte sensitivitesi düşüktür. Ek yöntemler kullanılarak duyarlılığı artırılabilir.

Anahtar Kelimeler: **CA19-9 antijeni; Karsinoembriyonik antijen; Mide kanserleri; Nükleozid difosfat kinaz A; Peritoneal yıkama.**

Abstract

Background: Approximately 50% of patients with serosa-invasive gastric carcinoma develop peritoneal recurrence and die of this disease during the first 2 years, even if curative resection is performed. Peritoneal lavage samples (PLS) from 31 patients with gastric adenocarcinoma were obtained at laparotomy and the free cancer cells in the lavage solution were investigated. The aim of this study was to compare positive peritoneal lavage solution compare with expression in gastric carcinoma CEA, CA19-9, nm23 immunohistochemically and CEA and CA19-9 levels of systemic and portal venous blood.

Materials and Methods: Peritoneal lavage samples from 31 patients with gastric carcinoma were obtained at laparotomy. To identify the free cancer cells in the samples, cytopathologic examinations were performed. Systemic venous blood samples were taken from all diagnosed gastric malignancy patients. In addition, portal blood samples were taken in order to measure CEA and CA 19-9 levels in the blood samples. By immunohistochemical analyses for CEA, CA19-9 and nm23 were performed all gastric operation specimens. For statistical analyses, Chi-square and Fisher's exact test were used.

Results: The study group was comprised of 31 advanced gastric carcinoma patients. Of these patients, 16 were diffuse and the remaining 15 were diagnosed with intestinal type gastric carcinoma. Serosal invasion of tumor cells were established in 24 patients and of those patients, 6 had positive peritoneal lavage solutions. There were no patients with positive peritoneal lavage solution without serosal involvement. There was no significant correlation of immunohistochemical expression of CEA, CA19-9 and nm23 and PLS, although correlation of PLS and systemic CEA, CA19-9 and venous CEA levels were found to be significant ($p<0.05$).

Discussion: Cytologic examination for malignant cell investigation in PLS is a simple, inexpensive and quick method, however the sensitivity of this method is not very high. Additional methods could be used for the investigation of malign cells in PLS.

Key Words: **CA19-9 antigen; Carcinoembryonic antigen; Nucleoside diphosphate kinase A; Peritoneal lavage; Stomach neoplasms.**

Giriş

Mide adenokarsinomlarında peritoneal sıvıda bulunan serbest tümör hücreleri ile düşük sağ kalım arasında yakın ilişki olduğu saptanmıştır (1,2). Operasyon sırasında yapılan peritoneal yıkama sıvısında (PYS) kanser hücrelerinin saptanması için altın standart sitolojik inceleme olarak bilinmektedir.

Mide adenokarsinomlarında peritoneal metastazın, serozaya invaze tümörlerde serbest tümör hücrelerinin peritonea dökülmesi nedeni ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bununla birlikte bazı olgularda seroza invazyonu olmaksızın da peritoneal metastaz ortaya çıktığı saptanmıştır. Erken gastrik karsinomların %0,5'inde ve küratif bir operasyon yapılan kas tabakasına invaze tümörlerde peritoneal rekürrens geliştiği görülmüştür (3,4).

Mide adenokarsinomu tanısında tümör belirleyicilerinden carcinoembryonic antijen (CEA) ve CA 19-9'un düşük sensitivite ve spesifitesi hakkında genel bir birliktelik vardır (5,6). Bu tümör belirleyicilerinin ameliyat öncesi serum seviyelerinin prognostik değeri konusunda tartışmalar sürmektedir. Mide adenokarsinomlu hastalarda CEA ve CA 19-9'un ameliyat öncesi serum seviyelerinin prognostik değerini içeren klinik çalışmaların sonuçları çelişkilidir (7,8).

Tümörlerin malign davranışında asıl belirleyici olan ve prognozu yakından ilgilendiren metastazların gelişiminde metastaz baskılayan genlerin etkili olduğu bulunmuştur. Bunlardan ilk tanınanı nm23-H1 genidir ve metastaz oranı yüksek tümörlerde az, düşük olanlarda ise yüksek oranda tespit edilmiştir (9). Daha sonraki çalışmalarda nm23-H1 geni ile metastaz arasındaki ilişkinin daha çok tümör bağımlı bir ilişki olduğu yönünde veriler elde edilmiştir (10)

Bu çalışmanın amacı mide adenokarsinomu nedeni ile opere edilen 31 hastada intraoperatif elde edilen PYS ile spesmenin CEA, CA19-9 ve nm23 ile immunohistokimyasal boyanması ve operasyon öncesi ölçülen serum CEA, CA19-9 ve operasyon sırasında ölçülen portal ven CEA, CA19-9 seviyeleri arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır.

Hastalar ve Yöntem

Bu çalışmaya 2001 yılı içerisinde mide karsinomu nedeni ile opere edilen 31 mide karsinomlu hasta alındı. Hastaların

tümünde ameliyat öncesi endoskopik olarak tümör lokalizasyonu belirlendi, biyopsi alındı, histopatolojik olarak tanı kondu. Sistemik kanda CEA, CA19-9 seviyelerini belirleyebilmek amacı ile hastaların ameliyatından 3-5 gün önce 5 cc sistemik venöz kan örneği alındı. Operasyona alınan hastalarda laparatomiden hemen sonra, karın içi boşluğuna 100 cc serum fizyolojik verildi, 10 dakikalık beklemeden sonra 5 cc peritoneal yıkama sıvısı örneği alındı ve sitolojik inceleme yapıldı (11). Rezeksiyonun bitiminde yine CEA, CA19-9 seviyelerinin belirlenmesi için portal ven veya dallarının birinden aynı şekilde 5 cc kan alındı. Operasyondan sonra tüm spesmenler Patoloji Anabilim Dalına gönderildi.

PYS 3000 rpm/3 dakika santrifüje edilip havada kurutma yöntemi ile tespit edildi. Ardından May Grünwald-Giemsa boyası ile boyandı ve ışık mikroskobu ile incelendi.

Operasyon materyalleri Patoloji Anabilim Dalında histopatolojik incelemeye alındı. Tümör tipi Laurene göre diffüz ve intestinal tip olarak belirlendi. Tümöral dokulardan hazırlanan kesitlere CEA, CA19-9 ve nm23 antikoları immunohistokimyasal olarak uygulandı. Tüm sonuçlar elde edildikten sonra veriler Ki-kare ve Fisher testlerinden yararlanılarak değerlendirildi.

Bulgular

Serimizde yer alan hastaların 16'sı diffüz 15'i ise intestinal tipte mide adenokarsinomuna sahipti. Tümörü serozaya ulaşan 24 (%77) hastanın 22'sinde metastatik lenf nodu tespit edildi. Bu hastaların 23'ü evre III ve IV biri evre II mide karsinomuydu. Hastaların peritoneal yıkama sıvısı incelendiğinde sadece 6 hastada sitolojik pozitiflik bulundu. Bu hastaların yarısı diffüz yarısı intestinal tipte mide karsinomuna sahipti (Resim 1, 2). Serozal invazyon olmaksızın PYS'da pozitiflik bulunan hastamız mevcut değildir. PYS pozitif hastaların 3'ü intestinal diğer 3'ü ise diffüz tipteydi. Sitoloji pozitifliği CEA, CA19-9 ve nm23 ile immunohistokimyasal boyanma oranı arasında ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına rağmen ($p>0,05$), sistemik kanda yüksek bulunan CEA ve CA19 seviyesi ve portal kandaki CEA yüksekliği ile PYS pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişkili olduğu bulundu ($p<0,05$) (Tablo I, Resim 3,4,5).

Tartışma

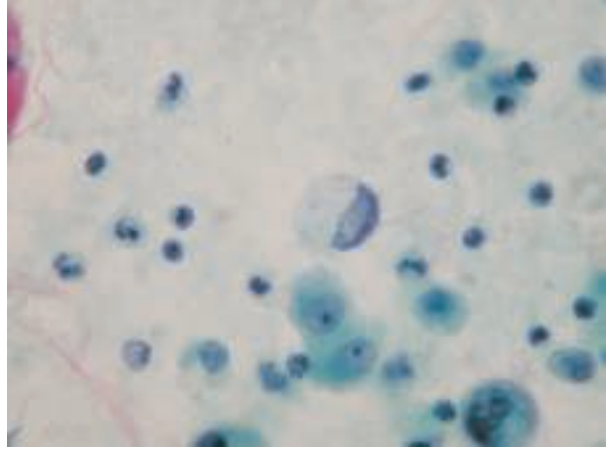
Serozaya invaze olmayan mide adenokarsinomlarında küratif cerrahi yapılmasına rağmen bazı hastalar peritoneal rekürrens nedeni ile kaybedilmektedir. Peritoneal

karsinomatoziste ileri sürülen görüşlerden birine göre; tümöral yapıdan ayrılan tümör hücreleri peritoneal boşluğa dökülmekte ardından periton boşluğunda yüzen bu hücreler subperitoneal bağ dokuya invaze olarak orada çoğalmaya başlamaktadır. Diğer görüşe göre lenfatik sistem aracılığı ile peritoneal metastazlar meydana gelmektedir (12)

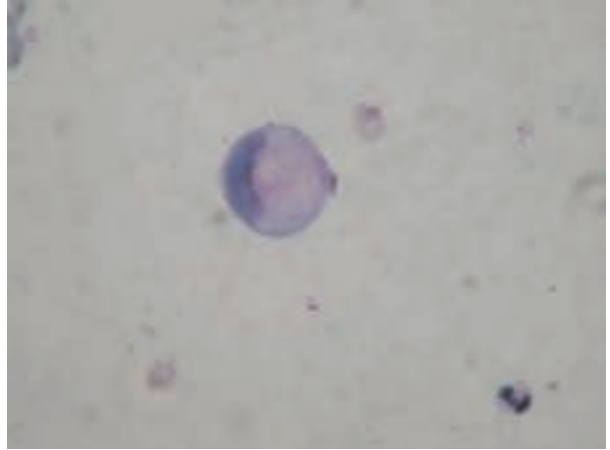
CEA ve CA19-9 seviyelerinin sistemik kanda yüksekliği ile PYS'da serbest tümör hücrelerinin bulunması arasında anlamlı ilişki olduğu yönünde yayınlar bulunmaktadır (12-14). Bizim çalışmamızda da sistemik kanda bulunan CEA, CA19-9 seviyesi ile periton sıvısında hücre bulunması arasında anlamlı ilişki bulunmaktadır.

Metastazın hücresel mekanizmasında nm23-H1 geninin fonksiyonu bugün tam olarak bilinmemektedir. nm23-H1 nükleosid difosfat kinaz olarak tanımlanmaktadır ve histidin kinaz gibi fonksiyon görebileceği ve ATP'den daha yüksek enerjili bir molekül olduğu yönünde bulgular vardır (15,16). nm23 ilk bulunan metastaz engelleyici genidir ve bu genin serozal infiltrasyon ve lenf bezi metastazı ile ilişkili olduğu yönünde yayınlar bulunmaktadır (17-19). Bizim çalışmamızda da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına rağmen periton sıvısında tümör buluna hastaların tümünde tümöral yapıda nm23 eksprese edilmediği gösterilmiştir.

Mide adenokarsinomlarında, peritoneal metastazın tanınmasında, PYS'nin sitolojik incelemesinin kolay ve kullanılabilir bir yöntem olmasına rağmen, sensitivitesinin düşük olduğu belirtilmektedir (20). Bu nedenle PYS'da serbest tümör hücrelerinin aranmasından daha etkili bir yöntem olan CEA'nın amplifikasyonu veya trypsinogen mRNA'nın reverse transkriptase-polymerase chain reaksiyonu (RT-PCR) ile bakılması yöntemi son zamanlarda gündeme gelmiştir (11). Bizim çalışmamızda da serozal invazyonu olan 24 hasta olmasına rağmen sitoloji pozitifliğinin düşük olması nedeni ile sıvıda atipik hücrelerin belirlenmesinde PYS'nin yetersiz olabileceği düşünülmektedir ve bu nedenle daha sonraki çalışmada yine PYS'de sitolojik incelemeye ek yöntemlerin araştırılması hedeflenmektedir.



Resim 1. Periton sıvısında taşlı yüzük hücresi ve reaktif mezothel hücreleri (PAP x400).

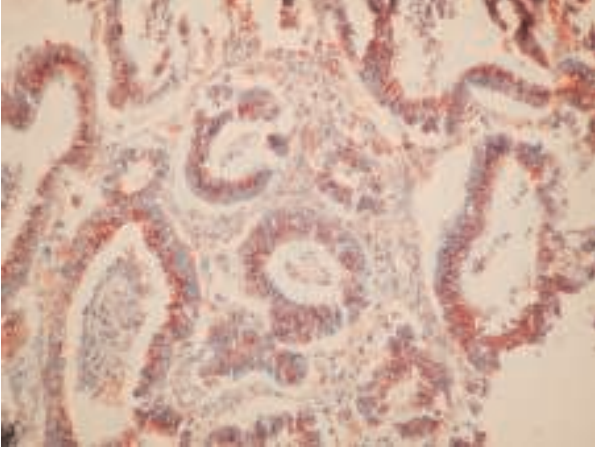


Resim 2. Periton sıvısında taşlı yüzük hücresi (PAP x1000).

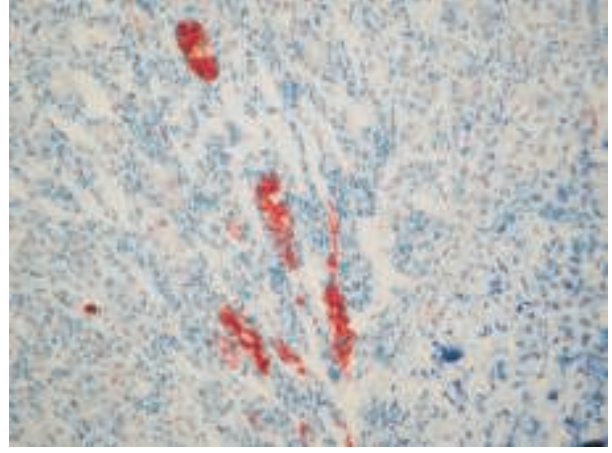
Tablo I. Sitolojik pozitifliğin immünohistokimyasal değerlerle ilişkisi

	Sitoloji + n=6 (%)	Sitoloji – n=25 (%)	p
Tm CEA IHK			
+ (n=23)	6 (100)	17 (64)	0,298
- (n=8)	0 (0)	8 (36)	
Tm CA19-9 IHK			
+ (n=23)	6 (100)	17 (64)	0,298
- (n=8)	0 (0)	8 (36)	
Sistemik CEA ↑			
+ (n=11)	5 (83)	6 (24)	0,013
- (n=20)	1 (17)	19 (76)	
Sistemik Ca19-9 ↑			
+ (n=7)	4 (67)	3 (13)	0,014
- (n=24)	2 (33)	22 (87)	
Portal CEA ↑			
+ (n=15)	6 (100)	9 (36)	0,018
- (n=16)	0 (0)	16 (64)	
Portal CA19-9 ↑			
+ (n=8)	3 (50)	5 (20)	0,137
- (n=23)	3 (50)	20 (80)	
Nm23			
+ (n=21)	0 (0)	21 (67)	0,074
- (n=10)	6 (100)	4 (33)	

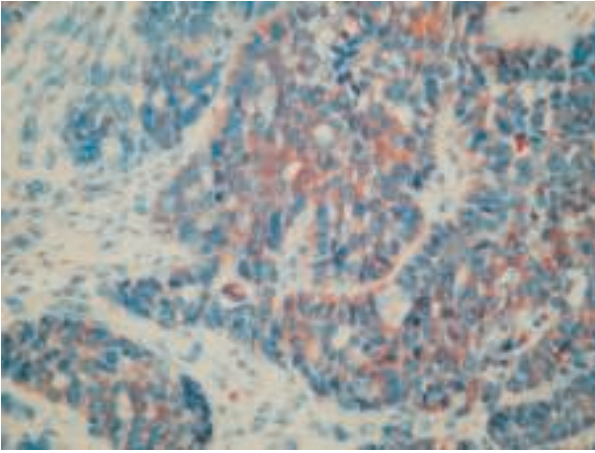
CEA : Karsinoembriyonik antijen;
IHK : İmmünohistokimyal boyama
↑ : Seviye yüksekliği



Resim 3. Tümöral dokuda CEA ile immünohistokimyasal boyama (x400).



Resim 5. Tümöral dokuda nm-23 ile immünohistokimyasal boyama (x400).



Resim 4. Tümöral dokuda CA19-9 ile immünohistokimyasal boyama (x400).

Kaynaklar

1. Ribeiro U, Gama-Rodrigues JJ, Safetle-Ribeiro AV, et al. Prognostic significance of intraperitoneal free cancer cell obtained by laparoscopic peritoneal lavage in patients with gastric cancer. *J Gastrointest Surg* 1998;2:244-249.
2. Kodera Y, Yamamura Y, Shimizu Y, et al. Peritoneal washing cytology: prognostic value of positive findings in patient with gastric carcinoma undergoing a potentially curative resection. *J Surg Oncol* 1999;72:60-65.
3. Shimada S, Yagi Y, Shiomori K, et al. Characterization early gastric cancer and proposal of optimal therapeutic surgery. *Surgery*. 2001;129:714-719.
4. Moriguchi S, Maehara Y, Korenaga D, Sugiuchi K, Nose Y. Risk factors which predict pattern of recurrence after curative surgery for patients with advanced gastric cancer. *Surg Oncol* 1992;1:341-346.
5. Wobbles T, Thomas CM, Segers MF, Nagengast FN. Evaluation of seven tumor markers (CA50, CA19-9, CA19-9 Tru Quant, CA72-4, AC195, Carcinoembryonic antigen, and tissue polypeptide antigen) in the pretreatment sera of patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1992 ;69:2036-2041.
6. Victorzon M, Haglund C, Lundin J, et al: A prognostic value of CA 19-9 but not of CEA in patients with gastric cancer . *Eur J Surg Oncol* 1995;21:378- 384.
7. Kodera Y, Yamamura Y, Torii A, et al: The prognostic value of preoperative serum levels of CEA and CA 19-9 in patients with gastric cancer. *Am J Gastroenterol* 1996;91:49-53.
8. Nakayama T, Watanabe M, Teramoto T, Kitajima M. CA19-9 as a predictor of recurrence in patients with colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 1997;66:238-43.
9. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 200-204.
10. Seifert M, Welter C, Mehraein Y, Seitz G. Expression of the nm23 homologues nm23-H4, nm23-H6, and nm23-H7 in human gastric and colon cancer. *J Pathol* 2005;205:623-632.
11. Marutsuka T, Shimada S, Shiomori K, et al. Mechanism of peritoneal metastasis after operation for non-serosa-invasive gastric carcinoma: An ultrarapid detection system for intraperitoneal free cancer cells and a prophylactic strategy for peritoneal metastasis. *Clin Cancer Res* 2003;9:678-685.
12. Bando E, Yonemura Y, Takeshita Y, et al. Intraoperative lavage for cytological examination in 1297 patients with gastric carcinoma. *Am J Surg* 1999;178:256-262.
13. Hudd C, LaRegina MC, Devine JE, et al. Response to exogenous cholecystokinin of six human gastrointestinal cancers xenografted in nude mice. *Am J Surg*. 1989;157:386-394.
14. Tokuda K, Natsugoe S, Nakajo A, et al Clinical significance of CEA-mRNA expression in peritoneal lavage fluid from patients with gastric cancer. *Int J Mol Med*. 2003;11:79-84.
15. Wallet V, Mutzel R, Troll H, et al. Dictyostelium nucleoside diphosphate kinase highly homologous to Nm23 and Awd proteins involved in mammalian tumor metastasis and Drosophila development. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1199-1202.
16. Biggs J, Hersperger E, Steeg PS, Liotta LA, Shearn A. A Drosophila gene that is homologous to a mammalian gene associated with tumor metastasis codes for a nucleoside diphosphate kinase. *Cell* 1990; 63: 933-940.
17. Chen JQ, Zhan WH, He YL, et al. Expression of heparanase gene, CD44v6, MMP-7 and nm23 protein and their relationship with the invasion and metastasis of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2004;10:776-782.
18. Ouatas T, Salerno M, Palmieri D, Steeg PS. Basic and translational advances in cancer metastasis: Nm23. *J Bioenerg Biomembr* 2003; 35: 73-79.
19. Wang YK, Ji XL, Ma NX. nm23 expression in gastric carcinoma and its relationship with lymphoproliferation. *World J Gastroenterol* 1999; 5: 87-89.
20. Moriguchi S, Maehara Y, Korenaga D, Sugimachi K, Nose Y. Risk factors which predict pattern of recurrence after curative surgery for patients with advanced gastric cancer. *Sur Oncol* 1992; 1:341-346.