AKADEMİK GASTROENTEROLOJİ DERGİSİ, 2006; 5 (3): 153-156

Safra kesesi kanserinde Helikobakter 16SrDNA ve üreaz gen analizi

Analysis of Helicobacter 16SrDNA and urease gene in gallbladder carcinoma

Arzu ÇELEBİ KOBAK[1], Şenol KOBAK[2], Funda YILMAZ[3], Ulus Salih AKARCA[1]

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Kliniği[1], İç Hastalıkları Kliniği[2], Patoloji Laboratuvarı[3], İzmir

Giriş ve amaç: Kronik kolesistit hastalarının, safra ve rezeke safra keselerinde, Helikobakter türlerinin varlığı gösterilmiştir. Bu veriler, Helikobakter türlerinin safra kesesi kanseri ile ilişkisini akla getirmektedir. Bu çalışmada, safra kesesi kanserinde Helikobakter DNA analizi amaçlanmıştır. **Gereç ve yöntem:** 1995-2000 yılları arasında EÜTF Patoloji laboratuvarında, rezeke safra keselerinde kanser saptanan 31 olgu çalışmaya alınmıştır. Bu hastaların parafin bloklarından alınan kesitlerde, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile Helikobakter 16SrDNA ve üreaz gen analizi yapılmıştır. Kontrol grubu olarak karaciğer transplantasyon donörü 10 olgunun normal safra kesesi dokuları kullanılmıştır. **Bulgular:** Safra kesesi adenokarsinomu olan tek bir olgunun tümöre komşu, tümörsüz safra kesesi dokusunda üreaz geni pozitif bulunmuştur. Safra kesesi kanserli diğer olguların, tümörlü ve tümörsüz dokularında ve kontrol grubunun normal safra kesesi dokularında Helikobakter 16SrDNA ve üreaz geni saptanmamıştır. **Sonuç:** Bu bulgular, safra kesesi kanseri ile Helikobakter türleri arasında öngörülen ilişkiyi desteklememektedir.

Anahtar sözcükler: Safra kesesi kanseri, Helikobakter, PCR

Background/aim: The presence of Helicobacter species has been shown in bile and the resected gallbladder of patients with chronic cholecystitis. Therefore, an association between Helicobacter and gallbladder carcinoma might be proposed. The aim of this study was to analyze the presence of Helicobacter DNA in gallbladder carcinoma. **Materials and methods:** Thirty-one patients diagnosed as gallbladder carcinoma in the EÜTF Pathology Laboratory between 1995-2000 were included in the study. Sections were taken from their paraffin-embedded gallbladder tissue. Polymerase chain reaction (PCR) for Helicobacter 16SrDNA and urease gene was performed. Normal gallbladder tissues of 10 liver transplantation donors were used as controls. **Results:** Helicobacter urease gene was found positive only in one patient with gallbladder adenocarcinoma. Helicobacter 16SrDNA and urease gene were both negative in all the gallbladder tissues of the other cases with gallbladder carcinoma and of the control group. **Conclusion:** Thus, our data did not support the proposed association between Helicobacter species and gallbladder carcinoma.

Key words: Gallbladder carcinoma, Helicobacter, polymerase chain reaction

GİRİŞ VE AMAÇ

Helikobakter pilori'nin (*H. pilori*), 1983 yılında ilk tanımlanmasından sonra, aktif kronik gastrit ve peptik ülser hastalığında etken olduğu gösterilmiştir (1-4). Epidemiyolojik analizler ve deneysel çalışmalar, *H. pilori*'nin insanlarda grup 1 karsinojen olup gastrik karsinogenez ile direk ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (5-7). Yakın zamanda; çeşitli memeli hayvanların, mide, barsak ve karaciğerlerinden *H. hepatikus, H. kanis, H. bilis, H. kolesistus* gibi farklı Helikobakter türleri izole edilmiş ve bu türlerin, hayvanlarda hepatit, karaciğer tümörü, kolanjiyofibrozis gibi hepatotobiliyer hastalıklara yol açabildiği gösterilmiştir (8-11). İnsanlarda da, hepatobiliyer sistem hastalıklarında, safrada ve hepatobiliyer dokularda helikobakter türlerine ait DNA varlığı saptanmıştır (12-16).

Fox ve ark., Şili'li kronik kolesistit hastalarının safra ve rezeke safra keselerinde, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile yüksek oranda (56.5%, 39.1%; sırasıyla) Helikobakter DNA pozitifliği saptamışlardır (15). Şili'de safra kesesi kanseri insidansı yüksek olduğundan, Helikobakter türleri ile safra kesesi kanseri arasında ilişki olabileceğini öne sürmüşlerdir. Literatürde safra kesesi kanserinde Helikobakter varlığı ile ilgili veriler sınırlıdır. Bu çalışmada; safra kesesi kanseri nedeniyle opere olmuş olguların, parafin bloklarından alınan kesitlerde Helikobakter DNA tayini yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

1995-2000 yılları arasında safra kesesi kanseri tanısı almış ve opere olmuş 31 hastanın klinik verileri ve patoloji preparatları retrospektif olarak tekrar değerlendirildi. Kontrol grubu olarak;

karaciğer transplantasyon donörü 10 olgunun safra keselerine ait patoloji preparatları incelendi. Otuzbir safra kesesi kanserli olgunun 13'ünde tümörlü doku yanında tümörsüz doku alanları da gözlendi. İncelenen tüm olguların parafin blokları çıkarıldı. Onüç olguda, tümörlü ve tümörsüz dokudan, diğer 18 olguda ise sadece tümörlü dokudan 10 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kontrol grubunun da, normal safra keselerine ait parafin bloklardan kesitler alındı. Parafinli doku lamlardan kazınarak ependorf tüplere koyuldu ve derin dondurucuda -80°C'de saklandı.

Saklanan parafinli doku örneklerinde, PCR ile Helikobakter 16SrDNA, üreaz gen tayini için şu işlemler gerçekleştirildi:

Deparafinizasyon: Ependorf tüpleri derin dondurucudan alınıp, parafinin erimesi için 10 dakika (dk) 65°C'de bekletildi. Sonrasında 1 ml ksilen ilave edilerek vortekslendi. Oda ısısında 30 dk beklendi. Bu süre içinde 5 dk.da bir vortekslendi. Beş dk 12000 rpm'de santrifüj edilip supernatan uzaklaştırıldıktan sonra yine 1 ml ksilen ilave edilerek aynı işlem tekrarlandı. Supernatan uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml etanol ilave edilerek vortekslendi. Beş dk 12000 rpm'de santrifüj edilip yine supernatan uzaklaştırıldı. Doku plakları havada bekletilerek etanolün tamamen uzaklaşması sağlandı ve homojenize edilerek tampon ilave edildi.

DNA ekstraksiyonu: Homojenizasyonu takiben, 0.5mg/ml proteinaz K içeren 150µl tampon çözeltisi (20mM Tris-HCL, pH 8.0 ve %0.5 Tween 20) ile 56°C'de bir saat inkube edildi. Örnekler 10 dk kaynatılarak proteinaz K ile denatüre edildi. Sonrasında 8000 g'de 10 dk santrifüj edilip supernatan alkolle presipite edilerek kalıp DNA olarak PCR işlemi için saklandı.

16SrDNA için PCR işlemi (16): On µl kalıp DNA alınarak bileşiminde 50mM KCl, 15mM TrisHCl, 15mM $MgCl^2$, 25mM her bir dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 2.5 ünite Taq polimeraz (Fermentas, Litvanya) ve her iki primerden 10pmol bulunan 50µl çözelti oluşturuldu.

Primerler:

HS1: 5'-AACGATGAAGCTTCTAGCTTGCTAG-3'

HS2: 5'-GTGCTTATTCGTTAGATACCGTCAT-5'

PCR işlemi, 94°C'de 3 dk denaturasyondan sonra 94°C'da 1 dk, 60°C'da 1 dk 30 saniye, 72°C'da 1 dk.lık döngülerden 40 döngü ile PCR yapıldı. En son 72°C'da 5 dk.lık uzatma uygulandı. PCR ürünü, %1.5 agarda elektroforez yapıldı ve baz uzunluğu 399 baz çifti olan bant araştırıldı. Kültür edilmiş *H. pilori*'nin seri dilusyonları ile hesaplanan PCR hassasiyeti 50-100 kopya olarak bulundu. Her grup örnekte pozitif kontrol olarak *H. pilori* pozitif olan mide biyopsi örnekleri kullanıldı.

Üreaz geni için PCR: Bütün örneklere üreaz genine (urease alpha subunit-urea amidohydrolase-ureaA) yönelik PCR amplifikasyonu da yapıldı. Bunun için nested PCR uygulandı (17). Birinci basamak PCR için 10µl kalıp DNA içeren, bileşimi 50mM KCl, 50mM TrisHCl, 15mM $MgCl^2$, 25mM her bir dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 2.5 ünite Taq polimeraz ve her iki eksternal primerden (H3: 5'-GCCAATGGTAAATTAGTTCC-3'), H4: 5'-TTACTCCTTAATTGTTTTTAC-3') 10pmol olan 50µl çözelti kullanıldı. Üç dk 94°C'lik denaturasyondan sonra 1 dk 94°C, 1 dk 50°C, 1 dk 70°C'deki döngülerden 35 döngü ile PCR yapıldı. Son olarak 70°C'de 5 dk.lık uzatma uygulandı. İkinci basamak PCR için birinci basamak PCR ürününden 10µl alınıp birinci basamaktaki ile aynı şartlarda PCR yapıldı. Burada dış primerler yerine iç primerler (H5: 5'-TTCTTTGAAGTGAATAGATGC-3', H6: 5'-ATAGTTGTCATCGCTTTTAGC-3') kullanıldı. PCR ürününden 10µl alınıp %1.5 agar jelinde elektroforez yapıldı. UV ışığında 258 baz uzunluğundaki bant araştırıldı. Bu PCR'ın hassasiyeti, kültür edilmiş *H. pilori* ile 5-10 kopya olarak bulundu. Her PCR işleminde, *H. pilori* pozitif olan mide biyopsi örnekleri pozitif kontrol olarak kullanıldı.

BULGULAR

1995-2000 yılları arasında EÜTF Patoloji Laboratuvarı'nda, rezeke safra keselerinde kanser saptanan 31 olgunun, 13'ünün EÜTF Genel Cerrahi Kliniği'nde, diğer olguların ise başka hastanelerde opere olduğu saptandı. Demografik değerlendirmede; olguların 20'si kadın, 11'i erkek ve ortalama yaş 67 idi. EÜTF Genel Cerrahi Kliniği'nde opere olmuş 13 olgunun 11'inde eşlik eden safra kesesi taşı da mevcuttu. Diğer olgularda bu bilgiye ulaşılamadı.

Patoloji preparatları tekrar incelendiğinde; kanser tipinin ağırlıklı olarak adenokarsinom (%87) olduğu görüldü. İki olgu, skuamöz hücreli karsinom, bir olgu adenoskuamöz karsinom ve bir olgu da anaplastik karsinom olarak değerlendirildi. Olguların sadece 13'ünde tümörlü dokunun yanında tümörsüz safra kesesi dokusu da vardı.

Tüm tümörsüz safra kesesi alanlarında kronik kolesistit bulguları saptandı. Diğer 18 olguda ise sadece tümörlü alanlar mevcuttu. Kontrol grubu olarak çalışmaya alınan 10 karaciğer transplantasyon donörünün safra keseleri normal olarak değerlendirildi.

Safra kesesi kanseri olgularının ve kontrol grubunun parafin bloklarından alınan kesitlerde PCR ile Helikobakter 16SrDNA ve üreaz gen analizi yapıldı. Sadece, adenokarsinom olarak değerlendirilen bir olgunun, tümöre komşu, tümörsüz safra kesesi dokusunda üreaz geni pozitif bulundu. Diğer safra kesesi kanserli olguların, tümörlü ve tümörsüz dokularında, kontrol grubu olguların normal safra keselerinde Helikobakter 16SrDNA ve üreaz geni negatif bulundu.

Hasta bilgileri ve Helikobakter DNA sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Helikobakter 16SrDNA varlığı gösterememişlerdir (21). Çalışmalardaki hasta ve sağlıklı kontrol grubu sayılarının azlığı, Helikobakter türlerinin bölgesel dağılımındaki farklılıklar ve kullanılan PCR yönteminin duyarlılığı, farklı sonuçlardan sorumlu tutulabilir.

H. pilori'nin yol açtığı kronik inflamasyon ile gastrik karsinogenez arasındaki ilişki iyi bilinmektedir. Ancak; hepatobiliyer karsinogenezde, Helikobakter türlerinin patojenitesi ile ilgili veriler sınırlıdır. Kronik hepatobiliyer enfeksiyonların, kronik inflamasyon aracılığı ile kanser oluşumunda rolü olduğu üzerinde durulmuştur. Fukuda ve ark., hepatobiliyer kanserli 19 Japon hastanın, %52.6'sının, safra ve hepatobiliyer doku örneklerinde, Helikobakter DNA pozitif bulmuşlardır. Helikobakter DNA pozitif olan grupta, biliyer inflamasyon derecesinin daha yüksek olduğunu

Tablo 1. Safra kesesi kanserli olguların özellikleri ve Helikobakter DNA sonuçları

Tümör tipi	Olgu sayısı	Kadın/Erkek	Safra kesesi taşı*	16SrDNA**	Üreaz geni***
Adenokarsinom	27	18/9	9/11	-	1
Skuamöz karsinom	2	2/0	1/1	-	-
Adenoskuamöz karsinom	1	0/1	1/1	-	-
Anaplastik karsinom	1	1/0	0/0	-	-

*EÜTF Genel Cerrahi Kliniği'nde opere olan safra kesesi kanserli hastalarda safra kesesi taşı sıklığı, **Helikobakter 16SrDNA pozitif örnek sayısı, ***Helikobakter üreaz geni pozitif örnek sayısı

TARTIŞMA

İnsanlarda değişik hepatobiliyer hastalıklarda, safra ve hepatobiliyer dokuda Helikobakter DNA varlığı araştırılmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Kronik kolesistit ve safra kesesi taşı hastalarındaki sonuçlar da çelişkilidir. Fox ve ark., Şili'li 23 kronik kolesistit hastasının, 13'ünde safra örneklerinde, dokuzunda da safra kesesi dokusunda Helikobakter DNA varlığını göstermişlerdir (15). Silva ve ark. da, kolesistitli 64 Brezilyalı hastanın, safra kesesi dokusunda %31.2, safra örneklerinde %42.9 oranında Helikobakter DNA pozitifliği saptamışlardır (18). Abayli ve ark., kolesterol safra taşlarının %9.1'inde PCR ile Helikobakter pozitifliği göstermişlerdir (19). Buna karşın; Mendez-Sanchez ve ark., safra kesesi taşı nedeniyle kolesistektomi olan 32 Meksikalı hastanın, sadece birinde, safra kesesi dokusunda PCR ile Helikobakter DNA pozitifliği bulmuşlardır (20). Benzer şekilde; Rudi ve ark. da, akut kolesistit, kronik kolesistit ve ana safra yolu tıkanıklığı olan Alman hastaların, safra ve pankreatik sıvı örneklerinde, ancak istatistiksel anlama ulaşmadığını görmüşlerdir. Helikobakter DNA varlığının, inflamasyondan bağımsız olarak biliyer hücre kinetiğini etkilediğini saptamışlardır. Bu verilere dayanarak; Helikobakter DNA pozitif hastalarda, biliyer hücre kinetiğinin, direk bakterinin kendisi veya indüklediği sitokin ve büyüme faktörleri tarafından hızlandırılmış olabileceğini öne sürmüşlerdir (22).

Bizim çalışmamızda; safra kesesi adenokarsinomu olan sadece bir hastanın, tümörlü dokuya komşu, tümörsüz safra kesesi dokusunda, nested PCR ile üreaz geni pozitif bulunmuş, diğer örneklerde Helikobakter DNA saptanamamıştır. Bu çalışmada, safra örneği çalışılmamış ve sadece 13 hastada tümörsüz safra kesesi dokusu elde edilebilmiştir. Safra kesesi kanserli hastaların safralarında doku invazyonu yapmayan Helikobakter türleri olabilir. Ayrıca, safra kesesi dokusu, kanser geliştikten sonra, Helikobakter türlerinin kolonizasyonu için uygunluğunu kaybediyor olabilir. Zou ve ark., gastrik kanser erken evrede, %57

oranında *H. pilori* pozitifliği bulurken, son evre kanserde hiç saptayamamışlardır (23). Safra kesesi kanserinde de, tümöre komşu, tümörsüz safra kesesi dokusunda Helikobakter kolonizasyonu daha iyi olabilir.

Safra kesesi kanseri patogenezinde, Helikobakter enfeksiyonunun etken olduğunu söyleyebilmek için, Helikobakter DNA varlığını göstermek yanısıra, mikroorganizma, safra ve hepatobiliyer dokuda üretilebilmelidir. Hayvan modellerinde yapılacak deneysel çalışmalar ve farklı insan populasyonlarında, yeterli sayıda hasta ve sağlıklı kontrol grubu ile yapılacak prospektif çalışmalar, bu konudaki bilgilerimizi artıracaktır.

KAYNAKLAR

1. *Lee A, Fox JG, Hazell S. Pathogenicity of Helicobacter pylori: a perspective. Infect Immun 1993; 61: 1601-10.*
2. *Graham DY, Malaty HM, Evans DJ Jr, et al. Epidemiology of Helicobacter pylori in an asymptomatic population in the United States: Effect of age, race, socioeconomic status. Gastroenterology 1991; 100: 1496-501.*
3. *Graham DY. Helicobacter pylori: Its epidemiology and its role in duodenal ulcer disease. J Gastroenterol Hepatol 1991; 6: 105-13.*
4. *Warren JR.Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active gastritis. Lancet 1983; i: 1273-5.*
5. *Personnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, et al. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. N Engl J Med 1991; 325: 1127-31.*
6. *Watanabe T, Tada M, Nagai H, et al. Helicobacter pylori induces gastric cancer in Mongolian gerbils. Gastroenterology 1998; 115: 642-8.*
7. *Honda S, Fujioka T, Tokieda M, et al. Development of Helicobacter pylori-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. Cencer Res 1998; 58: 5255-9.*
8. *Fox JG, Drolet R, Higgins R, et al. Helicobacter canis isolated from a dog liver with multifocal necrotizing hepatitis. J Clin Microbiol 1996; 34: 2479-82.*
9. *Fox JG, Li X, Yan L, et al. Chronic proliferative hepatitis in A/JCr mice associated with persistent H.hepaticus infection: a model of Helicobacter induced carcinogenesis. Infect Immun 1996; 64: 1548-58.*
10. *Franklin CL, Beckwith CS, Livingston RS, et al. Isolation of a novel Helicobacter species. Helicobacter cholecystus sp.nov., from the gallbladders of Syrian hamsters with cholangiofibrosis and centrilobular pancreatitis. J Clin Microbiol 1996; 34: 2952-8.*
11. *Ward JM, Anver MR, Haines DC, et al. Chronic hepatitis in mice caused by Helicobacter hepaticus. Am J Pathol 1994; 145: 959-68.*
12. *Nillson HO, Taneera J, Castedal M, et al. Identification of Helicobacter pylori and other Helicobacter species by PCR, hybridization and partial DNA sequencing in human liver samples from patients with primary sclerosing cholangitis or primary biliary cirrhosis. J Clin Microbiol 2000; 38: 1072-6.*
13. *Nillson H, Mulchandani R, Tranberg K, et al. Helicobacter species identified in the liver from patients with cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 2001; 120: 323-4.*
14. *Roe IH, Kim JT, Lee HS, et al. Detection of Helicobacter DNA in bile from bile duct diseases. J Korean Med Sci 1999; 14: 182-6.*
15. *Fox JG, Dewhirst FE, Shen Z. Hepatic helicobacter species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans wiht chronic cholecystitis. Gastroenterology 1998; 115: 755-63.*
16. *Avanaud P, Marais A, Monteiro L, et al. Detection of Helicobacter species in the liver of patients with and without primary liver carcinoma. Cancer 2000; 89: 1431-9.*
17. *Lin TT, Yeh C-T, Wu CS, et al. Detection and partial sequence analysis of Helicobacter pylori DNA in the bile samples. Dig Dis Sci 1995; 40: 2214-9.*
18. *Silva CP, Pereira-Lima J, Oliveira AG, et al. Association of the presence of Helicobacter in gallbladder tissue with cholelithiasis and cholecystitis. J Clin Microbiol 41; 12: 5615-8.*
19. *Abayli B, Colakoglu S, Serin M, et al. Helicobacter pylori in the etiology of cholesterol gallstones. J Clin Gastroenterol 2005; 39: 134-7.*
20. *Mendez-Sanchez N, Pichardo R, Gonzalez J, et al. Lack of association between Helicobacter sp coloniztion and gallstone disease. J Clin Gastroenterol 2001; 32: 138-41.*
21. *Rudi R, Rudy A, Maiwald A, et al. Helicobacter sp are not detectable in bile from German patients with biliary disease. Gastroenterology 1999; 116: 1016-7.*
22. *Fukuda K, Kuroki T, Tajima Y. Comparative analysis of Helicobacter DNAs and biliary pathology in patients with and without hepatobiliary cancer. Carcinogenesis 2002; 23: 1927-31.*
23. *Zou Y, Wu G, Feng D, et al. Changes on positive rate and distribution of Helicobacter pylori during progression of gastric cancer. Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao 1999; 24: 161-3.*