

T. C.
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı

**MESANENİN ÜROTELYAL KARSİNOMLARINDA VEGF, MMP-9 VE
TSP-1 İFADESİNİN TÜMÖR DERECE VE EVRESİ İLE İLİŞKİSİ**

Dr. Gamze Dönmez

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Yurdanur SÜLLÜ

SAMSUN-2007

TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince yetiŐmemde katkıları olan değerli hocalarıma, birlikte çalıŐtıđım asistan arkadaşlarıma, tüm Patoloji bölümü çalıŐanlarına, istatistiksel analiz aşamasında yardımcı olan arkadaşım Erhan etinođlu'na ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme çok teŐekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
Tablo Listesi	III
Şekil Listesi	IV
Özet	V
Abstract	VII
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
GEREÇ ve YÖNTEM	18
BULGULAR	21
TARTIŞMA	29
SONUÇLAR	35
KAYNAKLAR	36

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo I. Düşük dereceli ve yüksek dereceli tümörlerde, VEGF, MMP-9 ve TSP-1 skorlarının karşılaştırılması	23
Tablo II. İnvazyon derinliğine göre, VEGF, MMP-9 ve TSP-1 skorlarının karşılaştırılması	24
Tablo III. İnvaziv olan ve olmayan tümörlerde, VEGF, MMP-9 ve TSP-1 skorların karşılaştırılması	25
Tablo IV. Yüzeysel ve derin tümörlerde, VEGF, MMP-9 ve TSP-1 skorlarının karşılaştırılması	26
Tablo V. Yüzeysel kas ve derin kas invazyonlu tümörlerde, VEGF, MMP-9 ve TSP-1 skorlarının karşılaştırılması	27
Tablo VI. Negatif ve pozitif lenf nodları olan tümörlerde, VEGF, MMP-9 ve TSP-1 skorlarının karşılaştırılması	28

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. İnvazyon göstermeyen papiller ürotelyal karsinom	5
Şekil 2. Düşük dereceli ürotelyal karsinom	6
Şekil 3. Yüksek dereceli ürotelyal karsinom	7
Şekil 4. İnvaziv ürotelyal karsinomda lamina propria invazyonu	8
Şekil 5. İnvaziv ürotelyal karsinomda kas invazyonu	9
Şekil 6. Yüksek dereceli ürotelyal karsinomda VEGF ifadesi	21
Şekil 7. Yüksek dereceli ürotelyal karsinomda MMP-9 ifadesi	22
Şekil 8. Düşük dereceli ürotelyal karsinomda TSP-1 ifadesi	23

ÖZET

Amaç: Mesanenin ürotelyal karsinomlarında, anjiyogenik etkili vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) ile antianjiyogenik etkili trombospondin-1 (TSP-1)'in, tümörün derece ve evresi ile ilişkisini incelemek.

Gereç ve Yöntem: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında 1999-2006 yılları arasında ürotelyal karsinom tanısı almış, 103'ü transüretal rezeksiyon (TUR) ve 28'i radikal sistoprotektomi olmak üzere toplam 131 olguya ait kesitler retrospektif olarak incelendi. Tümörler, Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Üropatoloji Birliği (WHO/ISUP) (2004)'un öngördüğü sınıflamaya göre yeniden sınıflandırılıp, TNM (2002)'ye göre de evrelendirildi. Uygun bloklar seçilerek VEGF, MMP-9 ve TSP-1 ile immünohistokimyasal çalışma yapıldı. VEGF, MMP-9 ve TSP-1 ifadeleri, tümör hücrelerinde, sitoplazmik boyanma dikkate alınarak değerlendirildi. Tümörlü alanlarda, boyanma yaygınlığı ve boyanma şiddetine göre VEGF, MMP-9 ve TSP-1 ifadesi derecelendirildi. Bulunan derecelerin toplamından elde edilen değerler; 0-2 ise negatif (0), 3 ise hafif (1), 4 ise orta (2) ve 5-6 ise kuvvetli (3) boyanma olarak skorlandı.

Bulgular: Ürotelyal karsinom tanısı alan ve çalışmaya dahil edilen 131 olgunun 30'unda tümör epitelde sınırlı olup papiller tümör (pTa) iken, 35'i lamina propriaya (pT1), 41'i kas tabakasına (pT2), 25'i de yağ dokusuna ve/veya çevre dokulara invazyon (pT3 + pT4) göstermekteydi. Tümörlerin 53'ü düşük dereceli, 78'i ise yüksek dereceliydi. Yüksek dereceli tümörlerde, düşük dereceli tümörlere göre VEGF ve MMP-9 ifadesi artmakta, TSP-1 ifadesi azalmaktadır. Tümörün invazyon derinliği arttıkça, VEGF ve MMP-9 ifadesi artmakta, TSP-1 ifadesi azalmaktadır. Derin tümörlerde yüzeysel tümörlere göre, invazyon yapan tümörlerde yapmamışlara göre VEGF ve MMP-9 ifadesi artmakta, TSP-1 ifadesi azalmaktadır. Derin kas invazyonlu ve yüzeysel kas invazyonlu tümörler arasında ve lenf noduna metastazı olan ile olmayan tümörler arasında, VEGF, MMP-9 ve TSP-1 ifadesinde farklılık bulunamamıştır.

Sonuçlar: Mesanenin rotelyal karsinomlarında, yüksek evre ve derecedeki tümörlerde, düşük evre ve derecedeki tümörler ile karşılaştırıldığında, VEGF ve MMP-9 ifadesi artmış, TSP-1 ifadesi azalmıştır. VEGF ile MMP-9 ifadesi arasında pozitif, MMP-9 ile TSP-1 ifadesi arasında ise negatif ilişki mevcuttur.

Anahtar sözcükler: Mesane, rotelyal karsinom, evre, derece, metastaz, anjiogenezis, VEGF, MMP-9, TSP-1

ABSTRACT

Objective: To investigate the relation of vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), which both have angiogenic effect, and antiangiogenic trombospondin-1 (TSP-1) with the grade and stage of the tumor in bladder urothelial carcinoma.

Material and Method: Sections of 131 patients diagnosed with urothelial carcinoma between 1999-2006 in Ondokuz Mayıs University, Faculty of Medicine, Department of Pathology were investigated retrospectively. Of these patients, 103 underwent transurethral resection (TUR) and 28 underwent radical cystoprostatectomy. Tumors were re-evaluated according to the World Health Organization and International Society of Urological Pathology (WHO/ ISUP) (2004) classification and were staged according to TNM (2002). By the selection of proper blocks, immunohistochemical studies were performed for VEGF, MMP-9 and TSP-1. In the evaluation of VEGF, MMP-9 and TSP-1 expressions in tumors, cytoplasmic staining was taken into consideration. VEGF, MMP-9 and TSP-1 expressions in tumor areas were graded according to the staining diffusion and intensity. The values obtained by the addition of newly found grades were scored as negative when they were 0-2 (0), as mild when they were 3 (1), as moderate when they were 4 (2) and as severe when they were 5-6 (3).

Results: Of the 131 patients who were diagnosed with urothelial carcinoma and included in the study, 30 had papillary tumor restricted in the epithelium (pTa), 35 had lamina propria (pT1), 41 had tumors invasive to the muscular layer (pT2) and 25 had tumors invasive to the fatty tissue and/or to the adjacent tissues (pT3 + pT4). Fifty-three of the tumors were low grade and 78 were high grade tumors. In high grade tumors, VEGF and MMP-9 expressions were higher than those of low grade tumors, whereas TSP-1 expression was lower. As the invasion reached deeper, the VEGF and MMP-9 expressions became higher and TSP-1 expression became lower. In deeper tumors compared to superficial tumors and in invasive tumors compared to non-invasive tumors VEGF and MMP-9 expressions were higher while TSP-1 was lower. No difference was found among the VEGF, MMP-9 and TSP-1 expressions of the tumors invaded deep muscle and superficial muscle or tumors metastatic and non-metastatic to lymph node.

Conclusion: In bladder urothelial carcinomas, higher stage and grade tumors had higher VEGF and MMP-9 expressions but lower TSP-1 expressions when compared with lower stage and grade tumors. There was a positive relation between VEGF and MMP-9 expressions whereas there was a negative relation between MMP-9 and TSP-1 expressions.

Key Words: Urinary bladder, urothelial carcinoma, stage, grade, metastasis, angiogenesis, VEGF, MMP-9, TSP-1.

1- GİRİŞ VE AMAÇ

Mesanein ürotelyal karsinomu, mesane epitelinden köken alan ve tüm mesane tümörlerinin % 90'ını oluşturan malign bir tümördür. En sık görülen tümörler arasında dokuzuncu sırada (% 3.2) ve kanserden ölüm nedenleri arasında onikinci sırada yer alır (52).

Tümörün büyümesi ve metastazında önemli rol oynayan anjiyogenezis 1970'lerden bugüne ilgi konusu olmuştur. Tümör anjiyogenezinin düzenlenmesi, normal fizyolojik anjiyogeneze göre farklılık gösterir. Anjiyogenik faktörler ile antianjiyogenik faktörler arasındaki denge, tümör dokusu gibi hızla çoğalan hücrelerin bulunduğu ortamda anjiyogenez lehine bozulmaktadır (36, 45). Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve diferansiyasyonunu sağlayan, endotel hücrelerinin göçünde gerekli matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) salınımını da uyararak anjiyogenik bir faktördür (16, 18). MMP-9 ise ekstrasellüler matriksi ve bazal membranı hasara uğratan, ekstrasellüler depolardan VEGF gibi büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin salınımını uyararak diğer bir anjiyogenik ajandır (31, 60). Trombospondin-1 (TSP-1) ise endotel hücre proliferasyonu ve göçünü inhibe ederek ve endotelde apoptozise neden olarak etki gösteren doğal bir antianjiyogenik faktördür (63). Antianjiyogenik tedavinin prensibi, anjiyogenezisi herhangi bir basamağında engellemektir. Bunlar arasında, VEGF gibi anjiyogenik etkili faktörlerin inhibisyonu (antiVEGF stratejileri), TSP-1 gibi doğal antianjiyogeniklerin uygulanması (TSP-1 türevleri) ve MMP-9 gibi ajanların etkisini engelleyecek moleküllerin uygulanması (matriks metalloproteinaz inhibitörleri) yer alır (45).

Bu çalışmada, ürotelyal karsinomda, anjiyogenezisin, tümörün invazyon ve metastaz yapma potansiyelindeki önemini araştırmak amacıyla, anjiyogenik ajanlardan olan VEGF ve MMP-9'un ve antianjiyogenik ajan olan TSP-1'in tümörün derecesi, evresi ve lenf nodu metastazı ile ilişkisi incelenmiştir.

2- GENEL BİLGİLER

2.1- Mesanenin anatomisi

Erişkinde boş mesane, küçük pelvisin ön alt kısmında yer alır. Dört kenarlı ters piramid biçimindedir ve vezikal fasya ile çevrilidir. Üst yüzü paryetal peritonla örtülüdür. Arka yüzü mesane tabanı olarak bilinir. Kadında vajen proksimali ve uterin serviksle, erkekte vas deferens ampullası ve vezikula seminalisle rektumdan ayrılır. Mesanenin ön üst ucu mesane apeksi olarak bilinir. Trigon, mesane tabanında yer alır ve mesane boynunun arkasına uzanır. Trigonun yan ve proksimal kısımlarında üreterler mesane içine oblik olarak girerler. Mesanenin en distal kısmı mesane boynu olarak adlandırılır. Mesane boynu, erkekte puboprostatik, kadında pubovezikal bağlarla sıkı bir şekilde korunur. Erkekte mesane boynu prostat bezi ile birleşir. Mesanenin yatağını arkada, kadında vajen, erkekte rektum, ön ve yanda, hem pubis kemikleri hem de internal obturatör ve levator ani kasları oluşturur.

Mesanenin arteriyel kan akımı internal iliak arterin dalı olan inferior vezikal arterden sağlanır. Venleri internal iliak venlere drene olur ve vezikal venöz pleksus biçimindedir. Erkekte bu pleksus mesane tabanı, prostat ve vesikula seminalisi sarar ve prostatik venöz pleksusla bağlantılıdır. Kadında mesane boynu ve üretrayı örter ve vajinal pleksusla ilişkilidir. Lenfatik drenajı internal ve eksternal iliak lenf düğümlerindedir. Mesane, T11-L2 sempatik sinirler ve S2-4 parasempatik sinirler ile inerve olur (56).

2.2- Mesanenin histolojisi

Mesane duvarı, içten dışa doğru sırasıyla, ürotelyum olarak adlandırılan epitel, lamina propria, muskularis propria ve adventisyadan oluşur. Mesane, üst yüzeyinde, paryetal peritonla temas ettiği yerde serozaya sahiptir (56). Bu tabakalar ürotelyal karsinomlu hastaların evrelemesi için kullanıldığından, mikroskopik olarak doğru tanımları önemlidir.

Mesane, üreter ve renal pelvisi döşeyen ürotelyum, çok tabakalı bir epiteldir. Normalde 4-6 hücre tabakasından oluşur. En üstte diğer hücreleri şemsiye gibi örten ve bu nedenle şemsiye hücreleri olarak adlandırılan hücreler ve en altta bazal membranın

üzerinde, bazal tabakayı oluşturan küboidal hücreler bulunur. Tipik olarak şemsiye hücrelerinin bazılarında longitudinal nükleer çentikler bulunur. Şemsiye hücreleri displastik olarak algılanmaması gereken nükleer atipi içerebilirler. Ürotelyumun bazal membranının altında lamina propria yer alır. Lamina propria, az sayıda elastik fibriller, sinirler, lenfatikler ve zengin vasküler ağ içeren sıkı bir bağ dokusudur. Lamina propriada, orta kısımda orta büyüklükte arter ve venler ve bu vasküler yapılarla ilişkili kısa düz kas demetleri bulunur. Bunlar muskularis propriadaki kaslarla ilişkisiz, izole ve ince kas demetleridir. Seyrek olarak, bu kas fibrilleri devamlılık gösterirler ve bu durumda bu tabaka muskularis mukoza olarak adlandırılır. Bu kas lifleri invazyon derinliği değerlendirilirken muskularis propria ile karıştırılmamalıdır (56). Mesane duvarında, özellikle lamina proprianın derin kısımlarında olgun yağ dokusu adacıklarının görülebileceği de invazyon değerlendirilirken akılda tutulmalıdır (8). Lamina propriadan sonra içte ve dışta longitudinal, merkezde sirküler, üç katlı düz kastan oluşan muskularis propria ve en dışta da adventisya yer alır (56).

2.3- Mesane kanseri

2.3.1- Epidemiyoloji

Mesane kanserleri, erkek ve kadında, tüm dünyada en sık görülen kanserler arasında % 3.2'lik oranla dokuzuncu, kanserden ölüm nedenleri arasında ise onikinci sırada yer alır (52). 2002 yılında yeni tanı almış 357,000 olgu bildirilmiştir. Erkeklerde kadınlara göre 3.5 kat daha fazla görülür (53). Her iki cinste de, en sık görüldüğü yerler, Batı Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya'dır (39). Mesane tümörlerinin % 98'i epitelyal kökenlidir ve bunların % 90'ı ürotelyal karsinomdur. Daha düşük oranda skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinom görülür. Kadın ve erkekte, bütün mesane kanserlerinin sırasıyla %1.1 ve %2.8'i skuamöz hücreli karsinom, %1.5 ve %1.9'u adenokarsinomdur (39).

2.3.2- Etiyoloji

Çevresel faktörlerden, sigara ve aromatik aminlere maruz kalma önemli risk faktörleridir. Mesane kanseri sigara içenlerde içmeyenlere göre 2-6 kat daha fazla görülür. Sigaranın kanser riskini arttırdığı gibi, tanı alındıktan sonra bırakılmadığında invaziv olmayan kanserlerde, seyri ve sonucu kötüleştirdiği gösterilmiştir (46).

Mesleki risk faktörlerinin mesane kanserlerinin % 25'inde rol oynadığı bildirilmiştir (54). Karsinojen olduğu gösterilen ajanlar arasında; anilin boyaları, yanıcı gazlar ve kömür tozu, muhtemelen klorize alifatik hidrokarbonlar ve kimyasal boyalarda, lastik ve tekstil sanayide kullanılan akroleyn gibi aldehitler sayılabilir (54). Oto sanayi, boyacılık, giyim sanayi, tesisatçılık ve deri sanayi gibi mesleklerde çalışanlar risk altındadırlar.

Fenasetin içeren analjeziklerin aşırı tüketimi (5 -10 yıllık bir sürede 5-15 kg) mesane kanseriyle ilişkilendirilmiştir (39, 46).

Kalıcı kateter ve taş varlığında, kronik sistit ve şişosoma hematobium sistitinde özellikle skuamöz hücreli karsinom olmak üzere kanser riskinin arttığı gösterilmiştir (39, 46).

Over veya serviks kanseri nedeniyle alınan radyoterapi ve kemoterapi (siklofosfamidli ya da siklofosfamidsiz) insidansı arttırmaktadır (9, 28).

2.4- Mesane Ürotelyal Karsinomlarının, Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Üropatoloji Birliğinin (WHO/ISUP) Önerdiği 2004 Sınıflaması (1, 39)

Normal

Hiperplazi

Yassı ürotelyal hiperplazi

Papiller ürotelyal hiperplazi

Atipili yassı lezyonlar

Reaktif (enflamatuvar) atipi

Önemi bilinmeyen atipi

Displazi (düşük dereceli intraürotelyal neoplazi)

Karsinoma in situ (CIS) (yüksek dereceli intraürotelyal neoplazi)

Papiller ürotelyal neoplaziler

Papillom

Düşük malignite potansiyelli papiller ürotelyal neoplazi

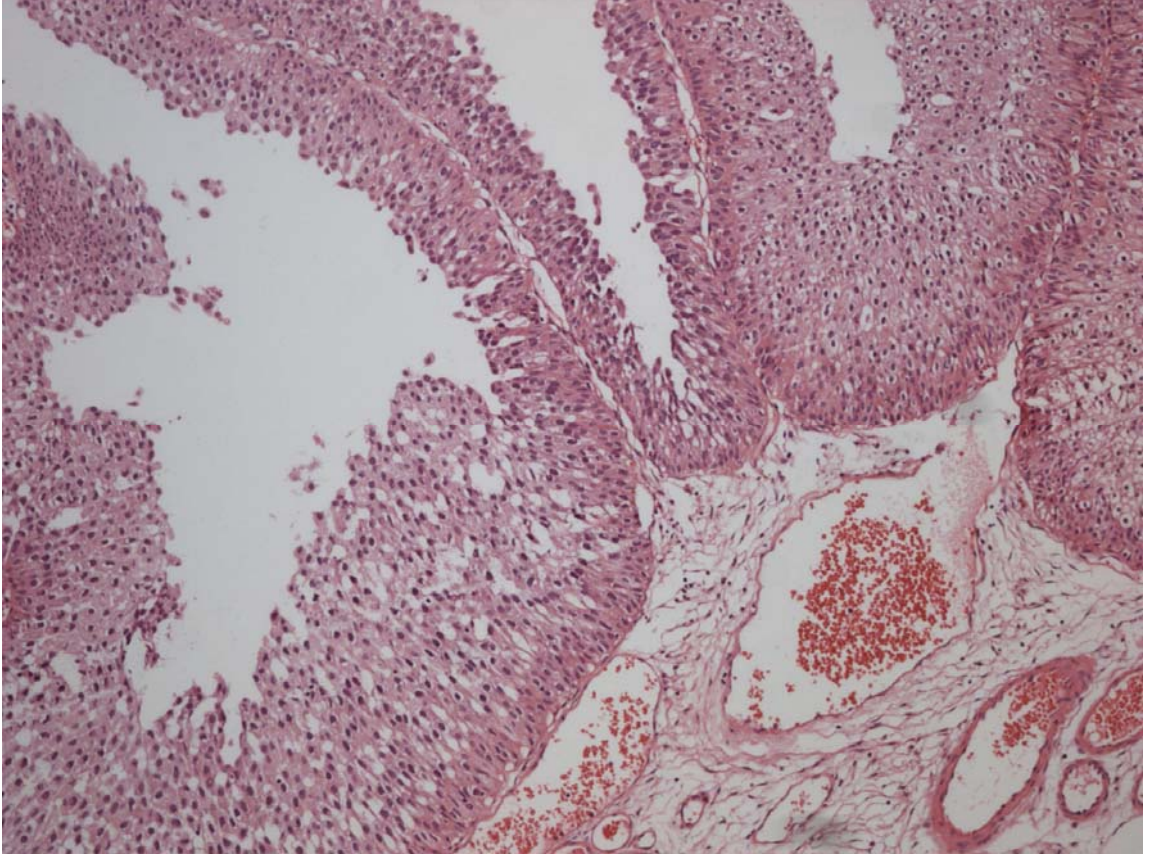
Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom

Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom

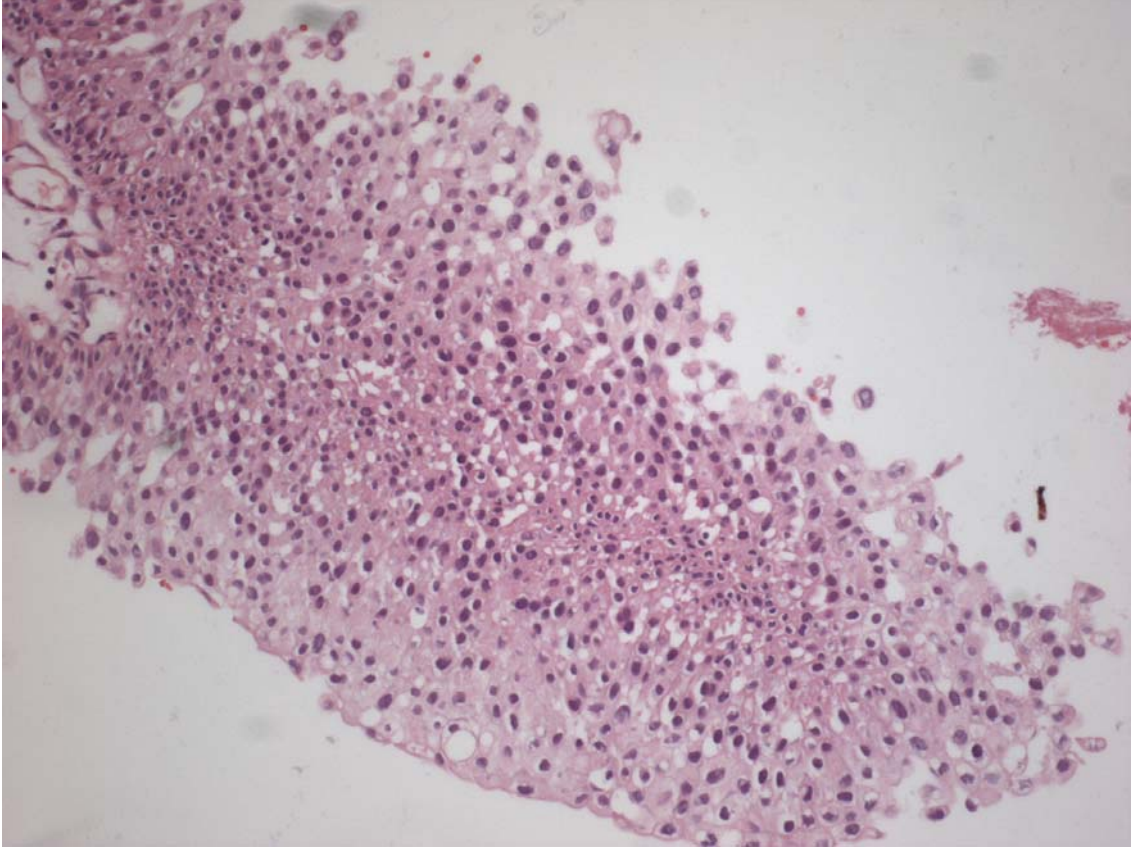
İnvaziv neoplaziler

2.4.1- Düşük Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom (DDPÜK)

İnsidansı 5/100.000'dir. Erkekke kadına göre 2.9 kat daha fazla görülür. Ortalama görülme yaşı 69.2'dir (26). Büyük büyütmelerde dahi düzenli görünümüne sahiptir. Polarite, nükleer büyüklük, şekil ve kromatin yapısında değişiklikler minimaldir ancak kesin hücresel atipi gösterir. Mitotik figürler sıktır ve genelde epitelin bazal yarısında görülür, ancak herhangi bir seviyede de olabilir. Tekrar görülme olasılığı sıktır ve hastaların % 48-71'inde meydana gelir. Ancak invazyon ve kanserden ölüm oranları düşüktür (30). (Şekil1, 2).



Şekil1. İnvazyon göstermeyen papiller ürotelyal karsinom (HE, X100)

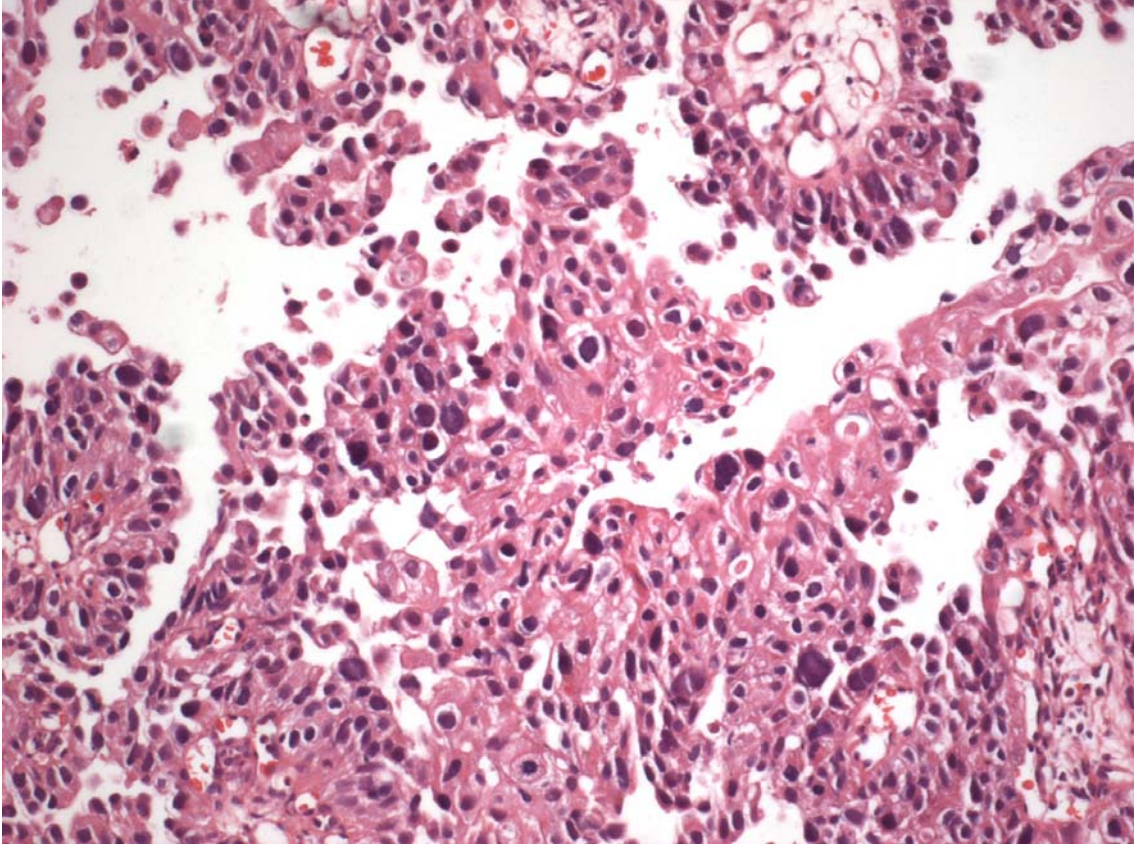


Şekil 2. Düşük dereceli ürotelyal karsinom (HE, X200)

2.4.2- Yüksek Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom (YDPÜK)

Küçük büyütmede hem yapısal hem de hüresel atipi belirgindir. Hücreler düzensiz kümeleşmiştir, orta dereceden şiddetli dereceye değişen pleomorfizm söz konusudur. Nükleer kromatin kümelenme eğilimindedir ve nükleol belirgin olabilir. Mitotik figürler tüm seviyelerde sıklıkla görülür (55). (Şekil 3).

YDPÜK'ler, DDPÜK'lara göre daha fazla ilerleme riskine sahiptir. İnvaziv hastalık ile birlikte olma yönünden daha yüksek risk taşırlar. Bu oran yaklaşık % 70-96 arasındadır. Çevre ürotelyumda CIS bulunabilir (1).

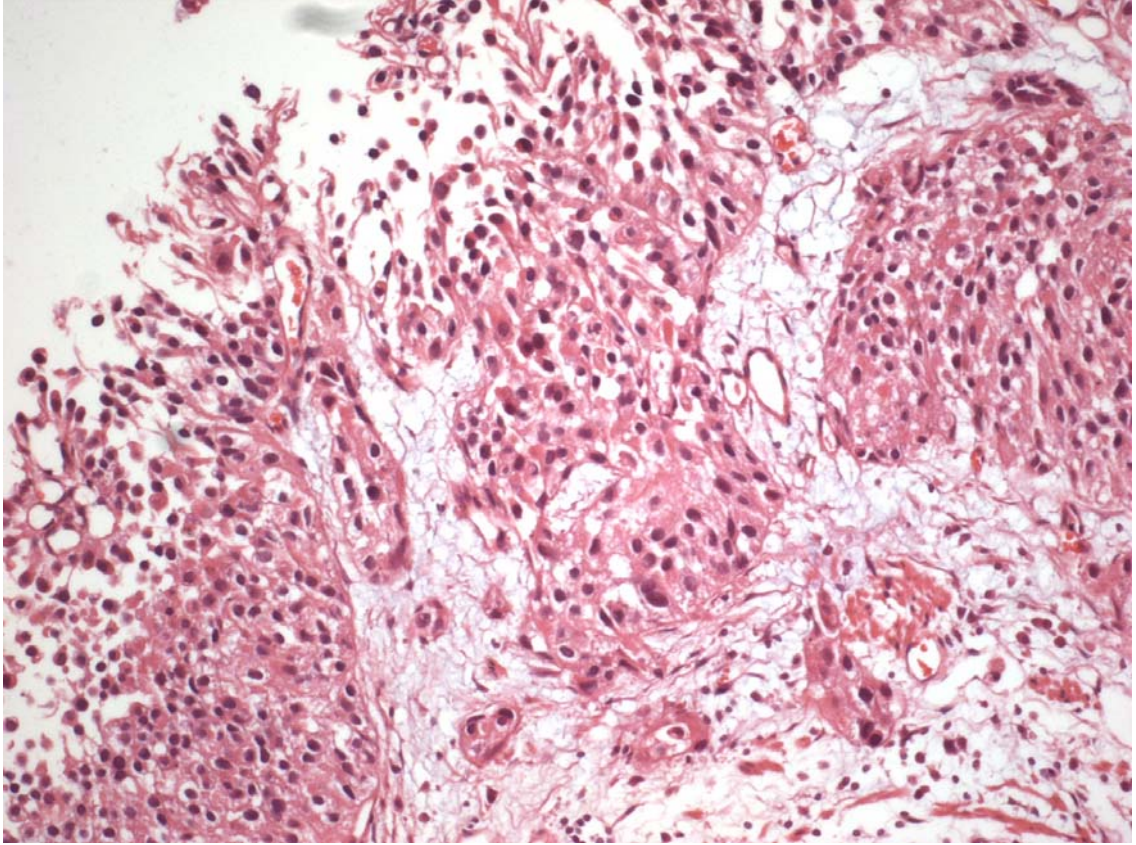


Şekil 3. Yüksek dereceli ürotelyal karsinom (HE, X200)

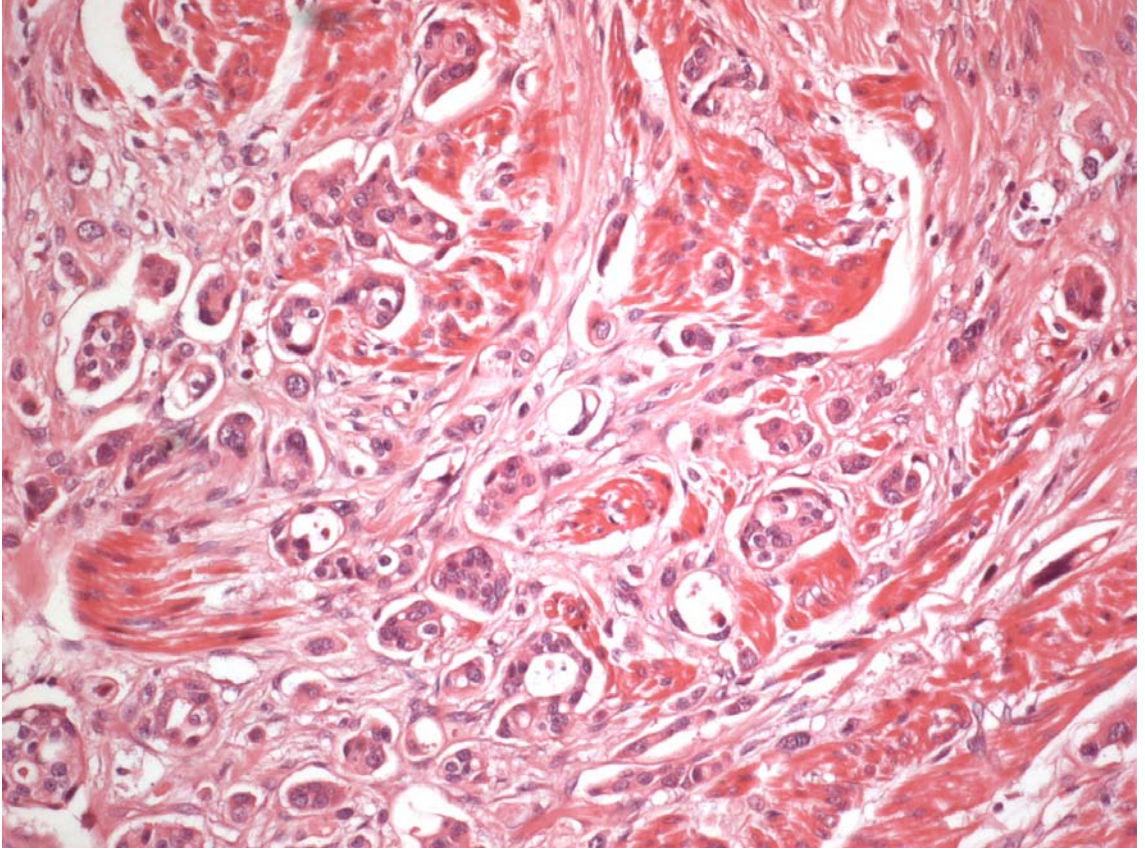
2.4.3- İnvaziv ürotelyal neoplaziler

İnvaziv ürotelyal karsinomlar, polipoid, sesil, ülser veya infiltratif lezyon oluşturabilirler. Tek ya da çok odaklı olabilirler. İnvaziv tümör diyebilmek için, tümör hücrelerinin bazal membranı aşmış lamina propriaya infiltre olmaları gerekir. Sadece lamina propria invazyonu gösteren tümörler (pT1) (Şekil 4) genellikle papiller tümörler olup, yüksek veya düşük dereceli özellikler taşıyabilirler. Kas (Şekil 5) veya daha derine invazyon gösteren tümörler (pT2-4) yüksek derecelidirler (39). Tümör, mesane duvarına yuvalar, kordonlar, trabeküller, küçük kümeler veya desmoplastik stroma ile birbirlerinden ayrılan tek hücreler tarzında infiltre olabilir. Genellikle yuvalar ve küçük kümeler şeklinde gözlenir de bazen diffüz olarak da görülebilir. Geleneksel tip invaziv ürotelyal karsinomun neoplastik hücreleri genellikle orta büyüklüktedir ve bir miktar

soluk veya eozinofilik sitoplazmalıdır. Bazen oldukça geniş, şeffaf veya koyu eozinofilik sitoplazmalı olabilir. Ürotelyal karsinomun hücrelerinin, ürotelyal karakterinin göstergeleri, uzunlamasına nükleer yarıkların varlığıdır ki bu genellikle düşük dereceli tümörlerde görülebilir. Fakat yüksek dereceli tümörlerde de odaksal olarak bulunabilir. Belirgin anaplastik, garip hiperkromatik çekirdeklerin gözlendiği yüksek dereceli ürotelyal karsinomlarda, lenfatik veya vasküler invazyon daha sık gözlenebilir (1, 2, 39).



Şekil 4. İnvaziv ürotelyal karsinomda lamina propria invazyonu (HE, X200)



Şekil 5. İnvaziv ürotelyal karsinomda kas invazyonu (HE, X200)

2.4.3.1-İnvaziv ürotelyal karsinom varyantları

Ürotelyal karsinomlar, geleneksel tip dışında farklı histolojilerde karşımıza çıkabilirler;

- **Skvamöz diferansiyasyonlu infiltratif ürotelyal karsinom:** Sıklıkla yüksek dereceli tümörlerde görüldüğünden kötü bir prognostik faktör olduğu düşünülmektedir. Radyoterapiye ve kemoterapiye iyi yanıt vermediği bildirilmiştir (1, 39, 42).
- **Glandüler diferansiyasyonlu infiltratif ürotelyal karsinom:** Skvamöz farklılanmaya göre daha az sıklıkta görülür. Yapılan bir çalışmada kemoterapiye kötü yanıt verdiği bildirilmiştir (1, 39).

- **“Nested” (yuva) tip:** Agresif bir neoplazmdır. Terapiye rağmen hastaların % 70’inde tanıdan sonra 4-40 ay içinde ölüm gerçekleşir (27).
- **Mikrokistik tip:** Sitolojik olarak sakindir. Sistitis sistika ile karışarak yanlış tanıya neden olabilir. Karsinomu, benignden ayırmada kritik nokta, epitelde şekil ve büyüklük farklılıklarının olması ve mesaneye gelişigüzel infiltrate olmasıdır. Prognostik önemi bilinmemektedir (39).
- **Mikropapiller tip:** Oldukça nadirdir. Yüksek metastaz ve ölüm oranıyla, yüksek derecede ve ileri evrede görülürler (29, 40, 41).
- **Lenfoepitelyoma benzeri karsinom:** İndiferansiye nazofaringeal karsinom veya lenfoepitelyomaya benzerliklerinden dolayı bu ismi alırlar. Az sayıdaki vakada saf formun kemoterapiye iyi cevap verdiği görülmüştür. Geleneksel karsinomla birlikte görüldüğünde, klinik gidiş, geleneksel formun evre ve derecesine bağlıdır (39).
- **Plazmasitoid tip:** Son birkaç yıl içerisinde plazmositomaya çarpıcı benzerlik gösteren az diferansiye ürotelyal karsinomlar rapor edilmiştir. Prognostik önemi bilinmemektedir (39).
- **Sarkomatoid tip:** Tüm sarkomatoid karsinomlar yüksek evrededir ve prognozları kötüdür. Son derece agresiftirler. Nodal ve uzak organ metastazı sıktır. Hastaların % 70’inde yaklaşık 17 ay içerisinde ölüm gerçekleşir (23, 38, 49).
- **Dev hücreli ürotelyal karsinom:** Çok seyrek. Prognozu kötüdür (1, 39).
- **Trofoblastik farklılanma ile birlikte olan ürotelyal karsinom:** Sinsityotrofoblastların varlığı kötü prognoz ile ilişkilidir. Çoğu vakada tanı konulması ile ölüm arasındaki süre 12 aydan kısadır (1, 39).
- **Şeffaf hücreli tip:** Mesanenin şeffaf hücreli karsinomu ya da böbrek ve prostatın metastatik karsinomlarıyla karışabilir. Sıklıkla kötü dereceli ürotelyal karsinomla ilişkilidir (39, 48).
- **Lipidden zengin tip:** Çok seyrek görülür. Tipik liposarkom ve taşlı yüzük hücreli karsinomdan ayırıcı tanısı yapılmalıdır (39).
- **Küçük hücreli tip:** Cerrahi rezeksiyon ile kombine, yeni kemoterapi protokollerine iyi cevap verir. Uzun sağkalım süreleri rapor edilmiştir (1).
- **İndiferansiye karsinom:** Sınıflamalara girmeyen tümör tiplerini kapsamaktadır(1).

2.5- Mesane Karsinomlarının TNM Evrelemesi (2002) (39)

T- Primer tümör

Tx Primer tümör bilinmiyor

To Primer tümör yok

Ta Non-invaziv papiller karsinom

Tis Karsinoma in situ “yassı tümör”

T1 Tümör subepitelyal bağ dokusuna invaze

T2 Tümör kasa invaze

T2a Tümör yüzeysel kasa invaze

T2b Tümör derin kasa invaze

T3 Tümör perivezikal dokuya invaze

T3a Mikroskopik

T3b Makroskopik

T4 Prostat, vagen, uterus, pelvik ve abdominal duvar invazyonu

T4a Tümör prostata, uterusu, vajene invaze

T4b Tümör pelvik duvara veya abdominal duvara invaze

N- Bölgesel lenf nodları

Nx Bölgesel lenf nodları bilinmiyor

No Bölgesel lenf nodlarına metastaz yok

N1 2 cm ve daha küçük büyüklükteki tek bir lenf noduna metastaz mevcut

N2 2 cm’ den büyük ama 5 cm’ den küçük tek lenf noduna veya çok sayıda 5 cm’ den küçük lenf nodlarına metastaz mevcut

N3 5 cm’ den büyük lenf noduna metastaz mevcut

M- Uzak metastaz

Mx Uzak metastaz bilinmiyor

Mo Uzak metastaz yok

M1 Uzak metastaz mevcut

Evre 0a	Ta	No	Mo
Evre 0is	Tis	No	Mo
Evre I	T1	No	Mo
Evre II	T2a,b	No	Mo
Evre III	T3a,b	No	Mo
	T4a	No	Mo
Evre IV	T4b	No	Mo
	T	N1,2,3	Mo
	T	N	M1

2.6- Prognoz

2.6.1- Klinik faktörler: Tümörün çok odaklı olması, prostatik üretra, posterior duvar veya mesane boynunda lokalize olması, tümör çapının 3 cm'den büyük olması, tümörün tekrarlaması ve ilerlemesinde önemli risk faktörleridir. Tümörün mesane dışına yayılımı, üreter orifisini infiltre etmesi, lenf nodu metastazının ve sistemik yayılımının olması kötü prognozla ilişkilidir (39).

2.6.2- Histopatolojik bulgular: Tümörün derecesi, invazyon derinliği, lenfatik ve/veya vasküler invazyon ve CIS odaklarının varlığı ile ürotelyal karsinomun bazı tipleri prognozda rol oynarlar. Histolojik derece lamina propria invazyonu (pT1) olan tümörlerde prognostik öneme sahiptir. Yüksek dereceli pT1 tümörlerde, tekrarlamının % 80, ilerlemenin % 60 ve 10 yıllık yaşam şansının % 35 olduğu gösterilmiştir. pT2 ve daha yüksek evreli tümörlerin çoğu yüksek dereceli olduğundan, bu tümörler için derecenin bağımsız prognostik değeri tartışmalıdır. Evrelemenin temeli olan invazyon derinliği en önemli prognostik faktördür (39). Muskularis mukozayı aşmış tümörlerde ilerleme oranı yüksektir. Sistektomide sadece lamina propria invazyonu olan tümörlerde 5 yıllık yaşam, % 75'ten fazla iken, muskularis propria invazyonunda % 40'a, perivezikal yağ doku invazyonunda % 20'ye düşmektedir. Benzer olarak bölgesel lenf nodu metastazı da kas ve perivezikal yağ doku invazyonu olan tümörlerde daha sıktır. Lenfatik ve/veya vasküler invazyonun varlığı kötü prognozla ilişkilidir. Özellikle de pT1 tümörlerde, lenfatik ve/veya vasküler invazyon varlığında, hastaların yaşam

sürelerinin kısaldığı ve 5 yıllık yaşam şansının % 44'lere düştüğü gösterilmiştir. Karsinoma in situ odakları olan tümörlerin çok daha agresif davrandıkları belirtilmiştir (39).

2.6.3- Genetik faktörler: Ürotelyal karsinomlarda çeşitli kromozomal değişiklikler tanımlanmıştır. Örneğin 9. kromozomda meydana gelen kayıp hem yüzeysel hem de invaziv tümörlerde tanımlanırken, 3p, 5p ve 17p'deki kayıplar yalnızca invaziv tümörlerde saptanmıştır. Bu moleküler bulguların özellikle de invaziv büyümede prognostik rol oynadığı belirtilmiştir (39). Tümör supresör genlerden, TP53'ün anormal ifadesi, özellikle de pT1 tümörler için kötü bir prognostik faktördür. Ancak bu sonuçları desteklemeyen çalışmalar da mevcuttur (39). Mesane kanserinin %10-40'ında anormal MDM2 (murine double minute 2) ifadesi bildirilmiştir. MDM2 geninin, TP53'ün transkripsiyon aktivasyonunu inhibe etme yeteneği mevcuttur. Normal hücrelerde TP53 aktivasyonu ile MDM2 ifadesi denge içerisinde. Ancak çalışmalarda anormal MDM2 ifadesinin tümör evresi ve derecesiyle ilişkisi konusunda tartışmalar mevcuttur (39, 61). Retinoblastom (Rb1) geninde mutasyonu olduğu saptanan hastaların, pT1 tümörlerinin ilerlemesinin arttığı ve kas invazyonu olanlarında yaşam sürelerinin kısaldığı gösterilmiştir (39). FHIT (fragile histidine triad)'ın azlığı ya da yokluğu, mesanenin ürotelyal karsinomlarının %61'inde saptanmıştır ve büyük çoğunluğunun da yüksek evreli tümörler olduğu rapor edilmiştir (61). Mesane tümörlerinde, hücre siklus düzenleyicilerinden p21 ve p27'deki değişikliklerin prognozla ilişkili olduğu saptanmıştır (39). Diğer bir hücre siklus düzenleyicisi de INK4 (Siklin bağımlı kinaz 4'ün inhibitörü)'dür ve p16 ve p19'u içerir. Bunlarda Rb ve p53 regülasyonunda rol oynamaktadırlar (61). Anjiyogenezis için değerlendirilen mikrodamar yoğunluğunun, kasa infiltre tümörlerde bağımsız bir prognostik faktör olduğu bildirilmiş, ancak ardından yapılan çalışmada bu sonuç desteklenememiştir. Azalmış TSP-1 ifadesinin, hastalığın tekrarı ve azalmış yaşam süresiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (39).

2.7- Tümör gelişimi ve anjiyogenez

Tümörün büyümesi sırasında küçük damarlar, tümöre besin, oksijen ve büyüme faktörleri sağlamak amacıyla sayıca artış gösterirler. Tümör, büyüklüğü 0.5 mm^3 'den daha küçük olduğunda oksijen ve gıdayı difüzyon ile çevreden alabilirken, 0.5 mm^3 'ün üstüne çıktığında yeni damar oluşumuna ihtiyaç duyar (6, 36, 44). Tümör anjiyogenezinin düzenlenmesi normal fizyolojik anjiyogeneze göre farklılık göstermektedir. Anjiyogenik faktörler ile antianjiyogenik faktörler arasındaki denge, tümör dokusu gibi hızla çoğalan hücrelerin bulunduğu ortamda anjiyogenez lehine bozulmaktadır (36, 45).

Yeni damar oluşumunda üç genel evre vardır:

- **Bazal membranın proteolitik enzimler tarafından yıkılması:** Normal, hastalıklı ya da hasarlı dokularda üretilip salgılanan anjiyogenik büyüme faktörleri komşu dokulara difüzyon yolu ile geçer. Anjiyogenik ajanlar, tümör hücrelerinden, monosit ve fibroblast gibi ortamdaki diğer hücrelerden salınabilir ya da kollajen matriksin yıkımı sonrasında açığa çıkabilir (34). Anjiyogenik büyüme faktörleri, yakınındaki, önceden varolan kan damarlarının endotel hücrelerinde bulunan özgün reseptörlere bağlanırlar. Büyüme faktörleri tarafından aktive edilen proteolitik enzimler, bazal membranın ve endotel hücrelerini döşeyen ekstrasellüler matriks bileşenlerinin yıkımına neden olur. Ekstrasellüler matriksin (ECM) enzimatik yıkımını, endotel hücrelerinin uyarılması ve kapiller filizlenme izler (4). Endotel hücrelerinin invazyon ve göç süreçleri, plazminojen aktivatör (PA) ve matriks metalloproteinaz sisteminin işbirliği ile olur. Ürokinaz-tip (u-PA) ve doku tip plazminojen aktivatörleri (t-PA) plazminojeni plazmine çevirir. ECM bileşenlerinin yıkılması ve MMP 1,3,9 elastaz gibi matriks metalloproteinazlarının aktivasyonu da plazminin işlevleri arasındadır (3, 17).

- **Endotel hücresi göçü ve çoğalması:** Anjiyogenik uyarı ile proteolitik yıkımdan kısa bir süre sonra endotel hücreleri aktive olurlar. Endotel hücreleri ekstrasellüler matrikse göç eder ve çoğalırlar. Bu süreçte en etkili anjiyogenik faktör VEGF'tir (17, 19).

- **Kapiller oluşum ve damar olgunlaşması:** Proteolitik yıkılma ve endotel hücresi göçünden sonra yeni oluşan kapillerler, yeni bazal membran

oluştururlar. Bu nedenle endotel hücrelerinin yeni kapiller yapılar oluşturabilmesi için birbirlerine ve ECM'e tutunması gereklidir. Damar olgunlaşınca anjiyogenez inhibitörlerinde artış gözlenir. Böylece endotel hücreleri sessiz bir hale bürünür ve damarlar kan akımını başlatmaya hazır hale gelir. ECM'inin proteolitik yıkımı da inhibe olur ve yeni oluşmuş kapillerler etrafında matriks bileşenleri sentez edilir (17, 36).

2.8- Vasküler endoteliyal büyüme faktörü (VEGF)

VEGF, Fibroblast büyüme faktörü 1,2,3,4 (FGF 1,2,3,4), Transforme edici büyüme faktör-alfa ve beta (TGF- α ve β), Epidermal büyüme faktörü (EGF), Tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), Trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) önemli anjiyogenik faktörlerdir. Anjiyogenik faktörler arasında en önemlisi ve üzerinde en çok durulana, vasküler geçirgenlik faktör (VPF) olarak da bilinen VEGF'dir. VEGF homodimerik, heparin-bağlayıcı glikoprotein yapısında bir molekül olup çeşitli alt grupları tanımlanmıştır. VEGF A, B, C, D, E ya da aminoasit sayılarına göre VEGF 121, 165, 189, 206 ve 145 gibi izoformları bulunmaktadır (20). VEGF biyolojik aktivitesini temel olarak üç reseptör ile gerçekleştirir. Tirozin kinaz yapısında olan bu reseptörler VEGF-R1(flt-1), VEGF-R2 (flk-1/KDR) ve VEGF-R3 (flt-4) olarak sıralanabilir. Bunlardan VEGF-R1 ve R2 endotel hücrelerinin üzerindeyken VEGF-R3 lenf damarları üzerinde bulunmaktadır (35). Anjiyogeneziste özellikle VEGF-A ve VEGF-B'nin, VEGF-R1 ve VEGF-R2 üzerinden etkili rol oynadıkları bilinmektedir. Tümör hücrelerince ifade edilen VEGF-C ve VEGF-D'nin de özellikle VEGF-R3 üzerinden lenfanjiyogeneziste ve lenfatik metastazda, VEGF-R2 üzerinden ise anjiyogeneziste önemli rol oynadıkları gösterilmiştir (43). VEGF reseptörlerinin aktivasyonu, bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinini fosforile ederek endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve diferansiyasyonunu sağlar (16). Nitrik oksit (NO), anjiyogenezin VEGF bağımlı bir mediyatörüdür. VEGF'in NO sentez enzimi üzerindeki uyarıcı etkisi sonucu oluşan NO, endotel hücre migrasyonunda rol oynar (37). Başta RAS ve HER-2 onkogenleri olmak üzere VEGF düzeyi; p53 gen mutasyonu, IL-1B, IL-6, IL-10, IL-13, FGF-4, PDGF, TGF- β , TNF- α ve NO gibi birçok endojen ajan ile düzenlenmekte ve tümör hücrelerinde VEGF ifadesi artmaktadır (57). VEGF, VEGF'e maruz kalan damarlarda, endotel hücreleri arasında

fenestrasyon oluşumuna olanak sağlayarak vasküler permeabiliteyi de artırır (5). Hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteinazlar ile ürokinaz ve doku tipi plazminojen aktivatörlerinin salınımını da uyarır. Böylelikle invazyon ve metastazı da kolaylaştırır (18).

2.9- Matriks metalloproteinaz- 9 (MMP-9)

Matriks metalloproteinazlar (MMPs), ekstrasellüler matriks komponentlerini ve bazal membranı hasara uğratan proteazların bir sınıfıdır. Normal fizyolojik durumlarda bu enzimler embriyonik büyüme, gelişme, dokunun yeniden şekillenmesi ve morfogenezinde rol oynarlar. Tümör hücreleri, stromal hücreler ve endotelial hücrelerden salınırlar. Bazal membranı aşma, tümör hücrelerinin doku invazyonu için önemlidir ve burada ekstrasellüler proteinazlar önemli rol oynar. Bu enzimler, proenzimler ve spesifik inhibitörlerle kontrol edilir. MMPs aktivasyonu endojen olarak üretilen metalloproteinaz doku inhibitörü (TIMP) ile baskılanır. MMPs, çinko bağımlı proteaz sınıfına dahildir. MMPs'lar kollajenaz, stromelisin, membran-tip ve jelatinazlar olarak altgruplara ayrılırlar. Tümör biyolojisinde en önemli olanlar jelatinazlardır. Proteazlardan ikisinin jelatinolitik aktivitesi vardır ve jelatinaz veya tip IV kollajenaz ismini alır. Bunlar MMP-2 veya jelatinaz A (72-kDA) ve MMP-9 veya jelatinaz B (92-kDA)'dır. MMP-2 ve MMP-9 jelatinazlar, bazal membranı aşmada önemli rol oynarlar. MMP-9, enflamatuar hücreler, nötrofiller, doku makrofajları ve uyarılmış bağ dokusu hücrelerince de salınır (21, 51). MMP-9, ekstrasellüler matriksi ve ağırlıklı olarak TipIV kollajen içeren bazal membranı hasara uğratar, ekstrasellüler depolardan VEGF gibi büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin salınımını uyarır, endotel hücrelerinin infiltrasyonunu ve migrasyonunu artırır. Sonuç olarak, malign tümörlerin invaziv ve metastatik karakter kazanmasını sağlar (31, 50, 60).

2.10- Trombospondin-1 (TSP-1)

Trombospondinler, ekstrasellüler matrikste doğal olarak bulunan bir proteindir. Hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimini sağlayan adhesif proteinler olup, 5 subtipi tanımlanmıştır. Bunlardan ilk tanımlanan TSP-1, 450 kDA, trimerik bir glikoproteindir (22, 28). İlk olarak trombositlerde keşfedilmiş olup sonradan endotelial hücreler, fibroblastlar, düz kas hücreleri, keratinositler, makrofajlar ve nötrofiller gibi çeşitli

hücre tiplerinde de gösterilmiştir (28). TSP-1'in hem anjiyogenik hem de antianjiyogenik etkilerinin olduğu rapor edilmiştir. Bu multifonksiyonel yapısı, makromolekül yapısı ve farklı hücre yüzey reseptörleri ile ilişkilendirilmiştir (63). TSP-1, antianjiyogenik etkisini, endotelial hücre proliferasyonu ve göçünü inhibe ederek ve endotelial apoptozise neden olarak göstermektedir (63). Yirmibeş kDA aminoterminal fragmanlı molekülün anjiyogenezi stimüle ederken, amino grubu içermeyen 140 kDA'lık parçalı molekülün anjiyogenezi inhibe ettiği rapor edilmiştir (22, 63). TSP-1, değişik membran reseptörlerine ve hücre proteinlerine bağlanır. Bunlardan bazıları CD36, integrin, integrin ilişkili proteinler, ayrıca bFGF, PDGF, TGF- β 1'dir. Örneğin TSP-1, bFGF'ye bağlandığında, endotel hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonunda önemli bir modülatör olan bFGF'nin etkisini göstermesini engellemektedir (63). TSP-1 molekülünde 2 bölge, triptofandan zengin WSXW bölgesi ve CD36 bağlayan bölge antianjiyogenik aktiviteye sahiptir. Bu bölgelerden elde edilen sentetik peptidler, tümörde yeni damar oluşumunu inhibe etmekte kullanılmışlardır. Normalde CD36 ifade etmeyen endotel hücreleri, TSP-1'in apoptotik aktivitesine duyarsızdırlar. Hücreler, CD36 ifade ettiklerinde TSP-1'in apoptotik aktivitesine duyarlı hale gelmektedirler (63). Onkogen aktivasyonu ve tümör süpresör genlerdeki değişiklikler de direkt ve indirekt olarak TSP-1 ifadesiyle ilişkilidir. Örneğin TP53 geninde mutasyon, VEGF ifadesinde artış ve TSP-1 ifadesinde azalmayla birlikte (63). TSP-1'in anjiyogenezi desteklediğini düşünen otörlerden bir kısmı da bunu, TSP-1'in, trombositlerin agregasyonu ve tümör trombosit agregasyonu üzerine etkisine bağlamaktadırlar. TSP-1, tümörlerin vasküler yayılımında, fibrinolizi engellemekten sorumlu tutulmuştur. Anjiyogenik aktivitenin, TSP-1 molekülünün santralinde özel bir bölgeye özgü olduğu tespit edilmiştir (63).

TSP-1'in, ekstrasellüler depolardan VEGF salınımının düzenlenmesinde etkili olması da önemli bir noktadır. TSP-1'in yokluğunda VEGF'in ve reseptörü VEGFR'nin arttığı gösterilmiştir (60).

TSP-1, ProMMP-9'un enzimatik aktivasyonunu da inhibe eder. MMP-9 aktivasyonunun da TSP-1'i suprese ettiği deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (60).

3- GEREÇ VE YÖNTEM

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında 1999-2006 yılları arası ürotelyal karsinom tanısı almış, 103'ü TUR ve 28'i radikal sistoprostatektomi olmak üzere toplam 131 olguya ait doku örnekleri çalışmaya alındı. Hastalar 22-92 yaşları arasındaydı (ortalama 63.74 ± 11.68). Ondördü kadın, 117'si erkekti.

Çalışmaya alınan olguların hematoksilin-eozin kesitleri tekrar değerlendirilerek WHO/ISUP(2004)'un öngördüğü sınıflamaya göre yeniden sınıflandırılıp, TNM (2002)'ye göre evrelemesi yapıldı (39, 61). Yüz otuz bir olgu invazyon derinliklerine göre, papiller, invazyon yapmayıp epitelde sınırlı olan (pTa), lamina propria invazyonu olan (pT1), kas invazyonu (pT2) ve çevre yağ dokuya geçmiş ve/veya komşu ve pelvik organ tutulumu olanlar (pT3 + pT4) olarak gruplandı. İnvaziv tümörlerde, invaziv alanların en iyi temsil edildiği, nekroz içermeyen, invaziv olmayan tümörlerde de tümörün en iyi temsil edildiği alanları örnekleyen bloklar seçilerek, VEGF, MMP-9 ve TSP-1 ile immünohistokimyasal çalışma yapıldı.

3.1- İmmünohistokimya

Dokuların tümü, %10'luk tamponlanmış nötral formaldehit solüsyonunda 24 saat fikse edilmiş ve parafinde bloklanmıştı. İncelenen kesitlerden, tümörü en iyi temsil eden, kanama ve nekroz içermeyen birer blok seçildi. Seçilen bloklardan 4 mikrometre kalınlığında kesitler alınarak VEGF (tüm VEGF tiplerini tanıyan, poliklonal rabbit Ab IgG, Neomarkers, CA, USA), TSP-1 (monoklonal mouse Ab IgG1, Clone A6.1, Ab-4, Neomarkers, CA, USA) ve MMP-9 (poliklonal rabbit Ab IgG, Ab-9, Neomarkers, CA, USA) primer antikorlarıyla streptavidin biotin peroksidaz yöntemi kullanılarak immünohistokimyasal çalışma yapıldı. VEGF için; bir anjiosarkom kesiti, TSP-1 için; kemik iliğindeki megakaryositler, MMP-9 için; plasentadaki trofoblastlar pozitif kontrol olarak kullanıldı. Çeşitli denemelerle en iyi dilüsyon oranları saptandı. VEGF ve MMP-9 1/100, TSP-1 1/50 oranında dilüe edilerek kullanıldı. Deparafinize edilen kesitlerin endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 10 dakika inkübe edilerek giderildi. Bundan sonra kesitler sitrat tamponu içerisinde 35 dakika kaynatılıp oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakıldı. Kesitlere 5'er dakika blok antikor, sonrada 1'er saat VEGF, TSP-1 ve MMP-9 primer antikorlar uygulandı.

Biotinli anti-immünglobulin ve streptavidin-peroksidaz konjugat ile 10'ar dakika inkübe edildi. Renklendirici ajan olarak 3,3'-diamino benzin (DAB) içeren kit (DAKO, Carpinteria, USA) kullanıldı. Son olarak kesitler Mayer Hematoksilen ile 60 saniye boyandı. Kesitler DAB uygulamasına kadar tüm aşamalarda pH 7.6 fosfat tamponu ile, DAB uygulamasından sonra ise distile su ile yıkandı. İşlemler oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Sonuçlar Leica HMLB45 (Germany, 2000) ışık mikroskobu ile VEGF, TSP-1 ve MMP-9 için sitoplazmik boyanma dikkate alınarak değerlendirildi. Seçilen her bir bloktaki tümörlü alanlarda boyanma yaygınlığı ve boyanma şiddetinin değerlendirilmesi semikantitatif olarak yapıldı. Boyanma yaygınlığı, mikroskopta tüm alanlarda, tümör hücrelerinin boyanma yüzdeleri 5 ve 5'in katları üzerinden değerlendirilerek aşağıdaki kategorilere atandı; MMP-9 ve VEGF için; tümör hücrelerinin %0-10'unda boyanma 0, %11-25'inde boyanma 1, %26-50'sinde boyanma 2, %50'sinden fazlasında boyanma 3 olarak, TSP-1 için ise; tümör hücrelerinin % 0-5 'inde boyanma 0, % 6-20'sinde boyanma 1, % 21-50'sinde boyanma 2, %50'sinden fazlasında boyanma ise 3 olarak derecelendirildi. Boyanma şiddetinin değerlendirilmesi ise, açık sarı boyanma 1, koyu sarı boyanma 2 ve kahverengi boyanma 3 olarak derecelendirilerek yapıldı. Bu iki derecenin toplamından elde edilen değerler 0-2 ise negatif (0), 3 ise hafif (1) , 4 ise orta (2) ve 5-6 ise kuvvetli (3) boyanma olarak skorlandı (28).

3.2- İstatistiksel yöntemler

İstatistiksel değerlendirmeler bilgisayar ortamında " SPSS 12.0 for Windows" programıyla yapıldı. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. Düşük dereceli tümörler ile yüksek dereceli tümörler arasında, invaziv tümörler ile invaziv olmayan tümörler arasında, yüzeysel tümörler ile derin tümörler arasında, metastatik lenf nodu olanlar ile metastatik lenf nodu olmayan tümörler arasında, yüzeysel kas invazyonu olan tümörlerle derin kas invazyonu olan tümörler arasında, VEGF, MMP-9 ve TSP-1 ifade skorlarının karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi, farklı invazyon derinliklerindeki tümörlerin VEGF, MMP-9 ve TSP-1 ifade skorlarının karşılaştırılması için Kruskal Wallis testi kullanıldı. $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

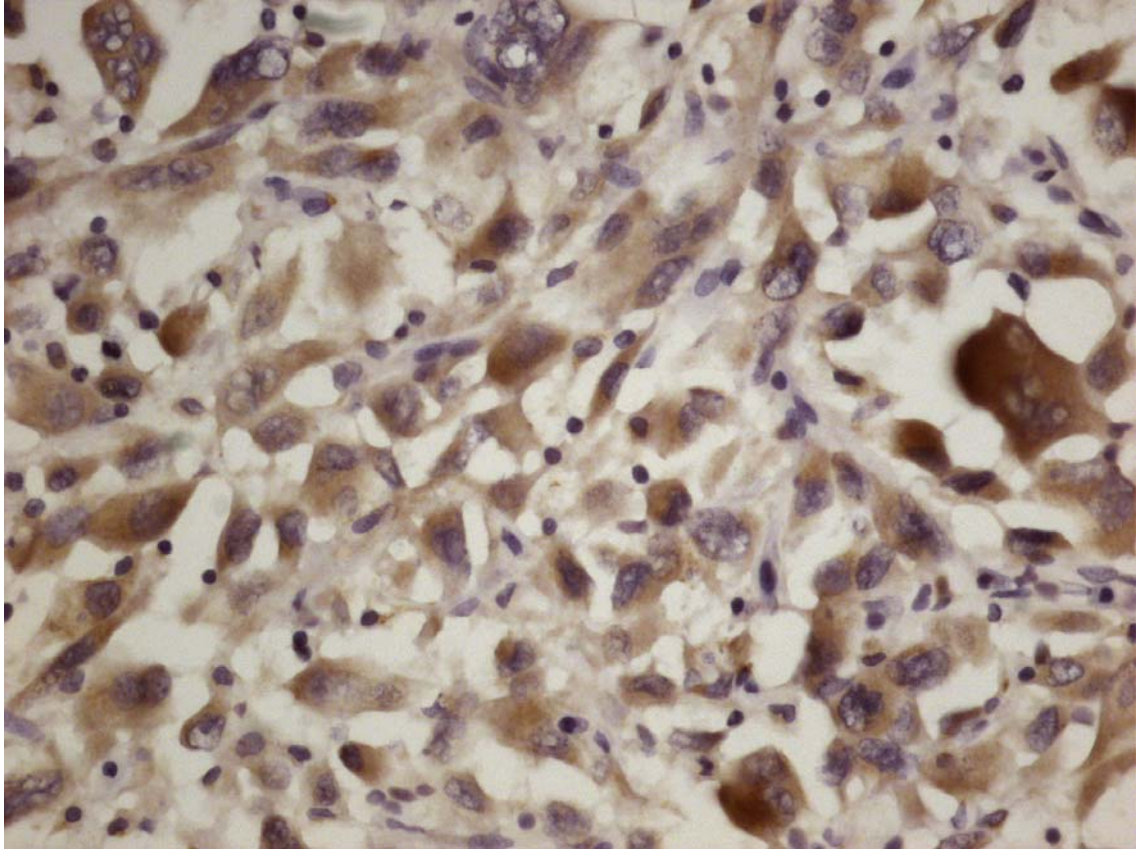
VEGF, MMP-9 ve TSP-1 ifadelerinin korelasyonunu değerlendirmek için de Spearman korelasyon testi kullanıldı.

4- BULGULAR

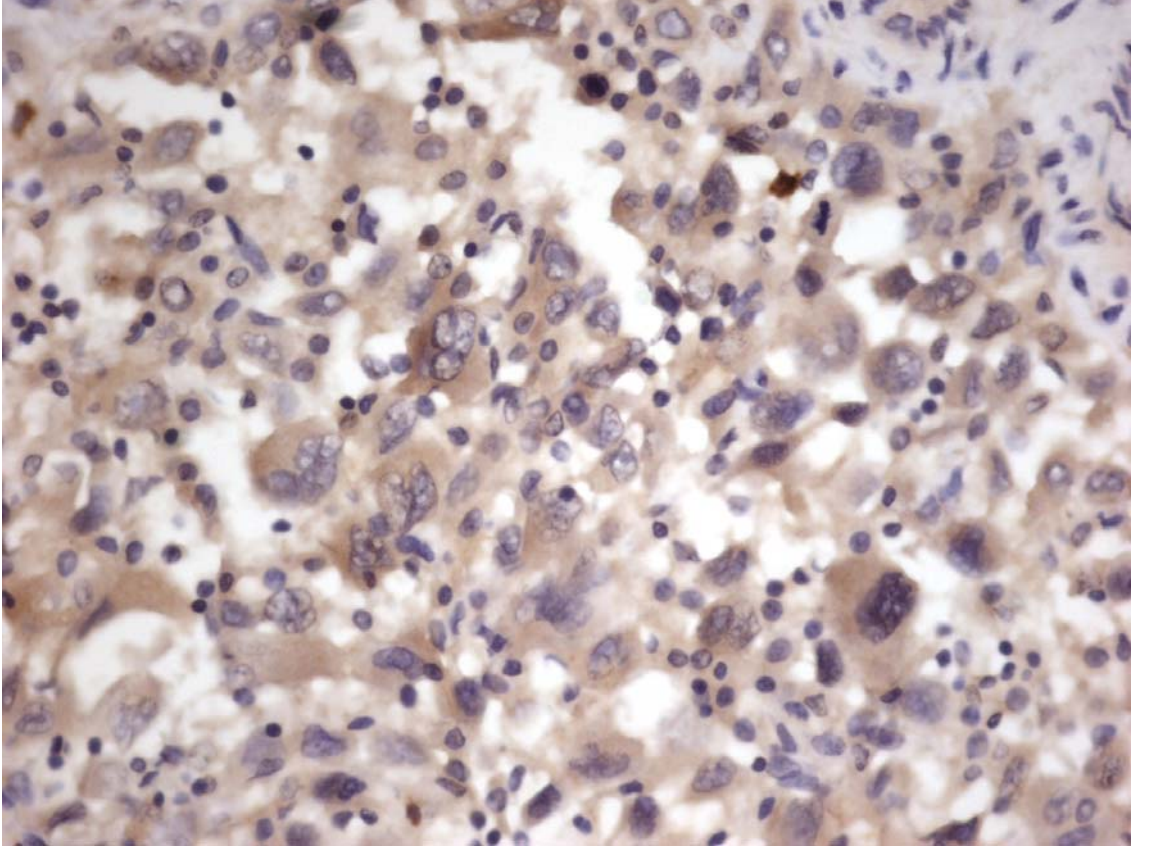
Ürotelyal karsinom tanısı alan ve çalışmaya dahil ettiğimiz 131 olgunun 30'u (%23) papiller düzenlenim gösteren ve epitelde sınırlı iken (pTa), 35'i (%27) lamina propriaya (pT1), 41'i (%31) kas tabakasına (pT2), 25'i (%19) de çevre yağ dokuya ve/veya komşu organlara (pT3 + pT4) invazyon gösteriyordu.

Elli üç (%40) olgu düşük dereceli, 78 (%60) olgu ise yüksek dereceli karsinomdu.

Düşük dereceli 53 tümörde ortalama VEGF skoru 2.6 ± 0.6 (median=3.00 (0.00-3.00), mod=3) ve MMP-9 skoru 2.2 ± 0.9 (median=2.00 (0.00-3.00), mod=3) olup, yüksek dereceli 78 adet tümörde ise ortalama VEGF skoru 2.9 ± 0.4 (median=3.00 (0.00-3.00), mod=3) ve MMP-9 skoru 2.7 ± 0.5 (median=3.00 (0.00-3.00), mod=3) idi. Yüksek dereceli tümörlerde, düşük dereceli tümörlere göre, VEGF ve MMP-9 immünreaktiviteleri artmakta olup ve bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı idi (sırası ile, $p=0.000$, $p=0.001$) (Tablo I). (Şekil6, 7).

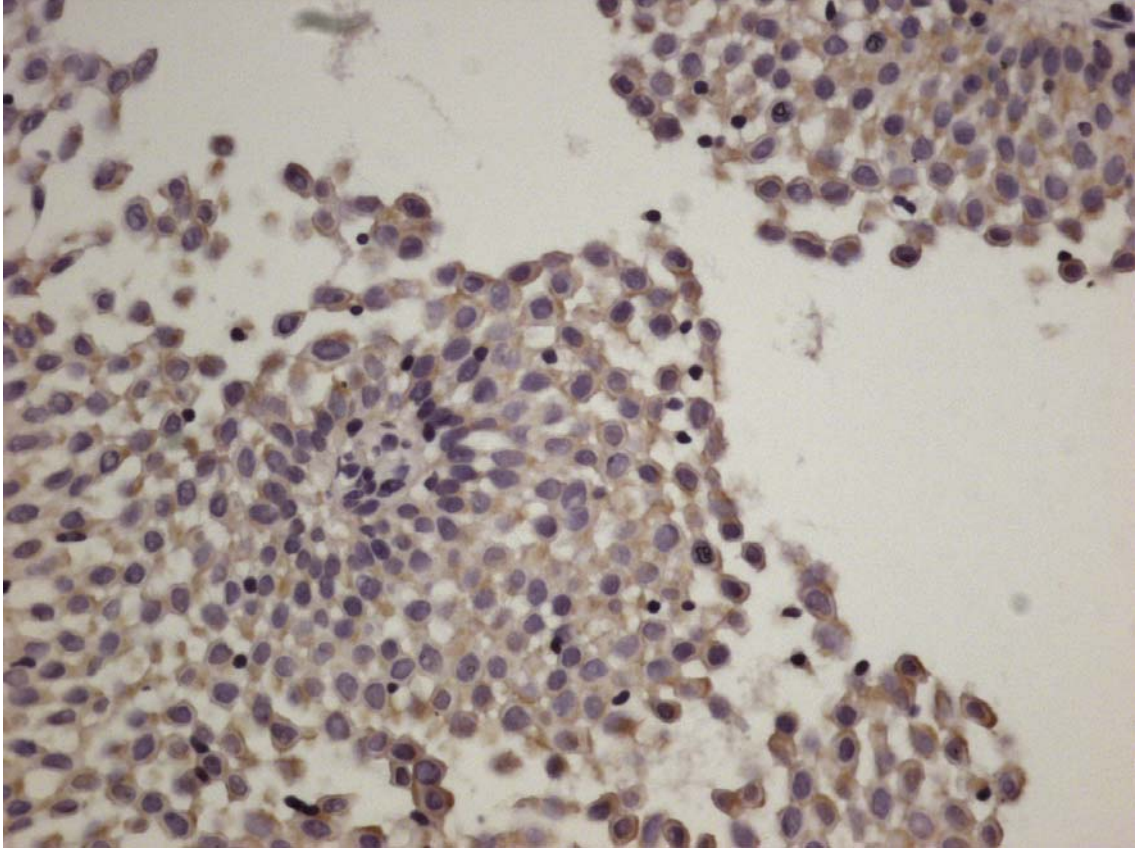


Şekil 6. Yüksek dereceli ürotelyal karsinomda VEGF ifadesi (HE, X400)



Şekil 7. Yüksek dereceli ürotelyal karsinomda MMP-9 ifadesi (HE, X400)

Düşük dereceli tümörlerde ortalama TSP-1 skoru 1.8 ± 1.1 (median=2.00 (0.00-3.00), mod=3), yüksek dereceli tümörlerde ise 0.5 ± 0.8 (median=0.00 (0.00-3.00), mod=0) idi. (Şekil 8) Yüksek dereceli tümörlerde, düşük dereceli tümörlere göre, TSP-1 immünreaktivitesi azalmakta olup bu azalış istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0.000$) (Tablo I).



Şekil 8. Düşük dereceli ürotelyal karsinomda TSP-1 ifadesi (HE, X400)

Tablo I: Düşük dereceli ve yüksek dereceli tümörlerde, VEGF, MMP-9 ve TSP-1 skorlarının karşılaştırılması

	Düşük dereceli n=53	Yüksek dereceli n=78	p
VEGF	2.6 ± 0.6	2.9 ± 0.4	0.000
MMP-9	2.2 ± 0.9	2.7 ± 0.5	0.001
TSP-1	1.8 ± 1.1	0.5 ± 0.8	0.000

Otuz pTa tümörde ortalama VEGF skoru 2.5 ± 0.7 (median=3.00 (0.00-3.00), mod=3) ve MMP-9 skoru 2.0 ± 1.1 (median=2.00 (0.00-3.00), mod=3), 35 pT1 tümörde ortalama VEGF skoru 2.8 ± 0.3 (median=3.00 (2.00-3.00), mod=3) ve MMP-9 skoru 2.3 ± 0.7 (median=3.00 (0.00-3.00), mod=3), 41 pT2 tümörde ortalama VEGF skoru 2.9 ± 0.4 (median=3.00 (0.00-3.00), mod=3) ve MMP-9 skoru 2.7 ± 0.4 (median=3.00 (2.00-3.00), mod=3), 25 pT3 + pT4 tümörde ortalama VEGF skoru 2.9 ± 0.4 (median=3.00 (1.00-3.00), mod=3) ve MMP-9 skoru 2.8 ± 0.3 (median=3.00 (2.00-3.00), mod=3) idi. İnvazyon derinliği arttıkça, VEGF ve MMP-9 immünreaktiviteyi artmakta olup bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0.001$, $p=0.000$) (Tablo II).

pTa tümörlerde ortalama TSP-1 skoru 2.2 ± 0.8 (median=2.00 (0.00-3.00), mod=3), pT1 tümörlerde 1.4 ± 1.0 (median=1.00 (0.00-3.00), mod=1), pT2 tümörlerde 0.3 ± 0.6 (median=0.00 (0.00-2.00), mod=0), pT3 + pT4 tümörlerde 0.1 ± 0.3 (median=0.00 (0.00-1.00), mod=0) idi. İnvazyon derinliği arttıkça, TSP-1 immünreaktivitesi azalmakta olup bu azalış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.000$) (Tablo II).

Tablo II: İnvazyon derinliğine göre, VEGF, MMP-9 ve TSP-1 skorlarının karşılaştırılması

	pTa n=30	pT1 n=35	pT2 n=41	pT3 + pT4 n=25	p
VEGF	2.5 ± 0.7	2.8 ± 0.3	2.9 ± 0.4	2.9 ± 0.4	0.001
MMP-9	2.0 ± 1.1	2.3 ± 0.7	2.7 ± 0.4	2.8 ± 0.3	0.000
TSP-1	2.2 ± 0.8	1.4 ± 1.0	0.3 ± 0.6	0.1 ± 0.3	0.000

Olgular, invaziv olmayan (pTa) ve invaziv tümörler (pT1 + pT2 + pT3 + pT4) olarak gruplandırılıp, VEGF, MMP-9 ve TSP-1 immünreaktiviteyi istatistiksel olarak değerlendirildi. İnvaziv olmayan 30 tümörde ortalama VEGF skoru 2.5 ± 0.7 (median=3.00 (0.00-3.00), mod=3) ve MMP-9 skoru 2.0 ± 1.1 (median=2.00 (0.00-3.00), mod=3) olup, invaziv olan 101 adet tümörde ise ortalama VEGF skoru 2.8 ± 0.4 (median=3.00 (0.00-3.00), mod=3) ve MMP-9 skoru 2.6 ± 0.5 (median=3.00 (0.00-3.00), mod=3) idi. İnvaziv tümörlerde, invaze olmamış tümörlere göre, VEGF ve MMP-9 immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p=0.000$, $p=0.001$) (Tablo III).

İnvaziv olmayan tümörlerde ortalama TSP-1 skoru 2.2 ± 0.8 (median=2.00 (0.00-3.00), mod=3) olup, invaziv tümörlerde ise 0.6 ± 0.9 (median=0.00 (0.00-3.00), mod=0) idi. İnvaziv tümörlerde, invaze olmamış tümörlere göre, TSP-1 immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p=0.000$) (Tablo III).

Tablo III: İnvaziv olan ve olmayan tümörlerde, VEGF, MMP-9 ve TSP-1 skorlarının karşılaştırılması

	pTa n=30	pT1 + pT2 + pT3 + pT4 n=101	p
VEGF	2.5 ± 0.7	2.8 ± 0.4	0.000
MMP-9	2.0 ± 1.1	2.6 ± 0.5	0.001
TSP-1	2.2 ± 0.8	0.6 ± 0.9	0.000

Olgular, yüzeysel (pTa + pT1) ve derin (pT2 + pT3 + pT4) tümörler olarak gruplandırılıp, VEGF, MMP-9 ve TSP-1 immünreaktiviteyi istatistiksel olarak değerlendirildi. Altmış beş yüzeysel tümörde ortalama VEGF skoru 2.6 ± 0.6 (median=3.00 (0.00-3.00), mod=3) ve MMP-9 skoru 2.2 ± 0.9 (median=2.00 (0.00-3.00), mod=3) olup, 66 derin tümörde ise ortalama VEGF skoru 2.9 ± 0.4 (median=3.00 (0.00-3.00), mod=3) ve MMP-9 skoru 2.8 ± 0.4 (median=3.00 (2.00-3.00), mod=3) idi. Derin tümörlerde, yüzeysel tümörlere göre, VEGF ve MMP-9 immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p=0.002$, $p=0.000$) (Tablo IV).

Yüzeysel tümörlerde ortalama TSP-1 skoru 1.8 ± 1.0 (median=2.00 (0.00-3.00), mod=3) olup, derin tümörlerde ise 0.2 ± 0.5 (median=0.00 (0.00-2.00), mod=0) idi. Derin tümörlerde, yüzeysel tümörlere göre, TSP-1 immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p=0.000$) (Tablo IV).

Tablo IV: Yüzeysel ve derin tümörlerde, VEGF, MMP-9 ve TSP-1 skorlarının karşılaştırılması

	pTa + pT1 n=65	pT2 + pT3 + pT4 n=66	p
VEGF	2.6 ± 0.6	2.9 ± 0.4	0.002
MMP-9	2.2 ± 0.9	2.8 ± 0.4	0.000
TSP-1	1.8 ± 1.0	0.2 ± 0.5	0.000

Yüzeyel kas (pT2a) ve derin kas (pT2b) invazyonu ayrımı yapılabilen 22 olgunun; 7'si yüzeyel kas, 15'i derin kas invazyonu gösteriyordu. Yüzeyel kas invazyonu olan 7 tümörde ortalama VEGF skoru 2.5 ± 1.1 (median=3.00 (0.00-3.00), mod=3) ve MMP-9 skoru 2.5 ± 0.5 (median=3.00 (2.00-3.00), mod=3) olup, derin kas invazyonu olan 15 tümörde ise ortalama VEGF skoru 2.9 ± 0.2 (median=3.00 (2.00-3.00), mod=3) ve MMP-9 skoru 2.8 ± 0.3 (median=3.00 (2.00-3.00), mod=3) idi. Derin kas invazyonlu tümörlerde, yüzeyel kas invazyonlu tümörlere göre, VEGF ve MMP-9 immünreaktivitesinde sayısal bir artış olsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0.783, p=0.298) (Tablo V).

Yüzeyel kas invazyonu olan tümörlerde ortalama TSP-1 skoru 0.4 ± 0.7 (median=0.00 (0.00-2.00), mod=0) olup, derin kas invazyonu olan tümörlerde ise 0.3 ± 0.7 (median=0.00 (0.00-2.00), mod=0) idi. Derin kas invazyonlu ve yüzeyel kas invazyonlu tümörler arasında, TSP-1 immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcut değildi (p=0.783) (Tablo V).

TabloV: Yüzeyel kas ve derin kas invazyonlu tümörlerde, VEGF, MMP-9 ve TSP-1 skorlarının karşılaştırılması

	pT2a n=7	pT2b n=15	p
VEGF	2.5 ± 1.1	2.9 ± 0.2	0.783
MMP-9	2.5 ± 0.5	2.8 ± 0.3	0.298
TSP-1	0.4 ± 0.7	0.3 ± 0.7	0.783

Olgulardan 10'unun lenf nodu tutulumu mevcutken, 18'inin lenf nodu tutulumu yoktu. Lenf nodu tutulumu olanlar ile lenf nodu tutulumu olmayanlar arasında, VEGF, MMP-9 ve TSP-1 immünreaktivitesi değerlendirildi. Lenf nodu tutulumu olmayan 18 tümörde ortalama VEGF skoru 2.7 ± 0.7 (median=3.00 (0.00-3.00), mod=3) ve MMP-9 skoru 2.8 ± 0.3 (median=3.00 (2.00-3.00), mod=3) olup, lenf nodu tutulumu olan 10 tümörde ise ortalama VEGF skoru 2.8 ± 0.6 (median=3.00 (1.00-3.00), mod=3) ve MMP-9 skoru 2.9 ± 0.3 (median=3.00 (2.00-3.00), mod=3) idi. Lenf nodu tutulumu olan ve olmayanlar tümörler arasında, VEGF ve MMP-9 immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p=0.981$, $p=0.981$) (Tablo VI).

Lenf nodu tutulumu olmayan tümörlerde ortalama TSP-1 skoru 0.1 ± 0.3 (median=0.00 (0.00-1.00), mod=0) olup, lenf nodu tutulumu olan tümörlerde ise TSP-1 ifadesi saptanmadı (median=0.00 (0.00-0.00), mod=0). Lenf nodu tutulumu olan ve olmayan tümörler arasında, TSP-1 immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p=0.494$) (Tablo VI).

TabloVI: Negatif ve pozitif lenf nodları olan tümörlerde, VEGF, MMP-9 ve TSP-1 skorlarının karşılaştırılması

	Negatif lenf nodu n=18	Pozitif lenf nodu n=10	p
VEGF	2.7 ± 0.7	2.8 ± 0.6	0.981
MMP-9	2.8 ± 0.3	2.9 ± 0.3	0.981
TSP-1	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.494

VEGF, MMP-9 ve TSP-1'in aralarındaki korelasyon değerlendirildiğinde, VEGF ile MMP-9 arasında, istatistiksel olarak anlamlı, zayıf, pozitif korelasyon ($p= 0.008$, $r= 0.23$), MMP-9 ile TSP arasında, istatistiksel olarak anlamlı, zayıf, negatif korelasyon ($p= 0.014$, $r= -0.21$) bulundu. VEGF ile TSP-1 arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon yoktu ($p= 0.061$, $r= -0.16$).

5- TARTIŞMA

Tümörler, 0.5-1 cm³'lük hacme kadar etraf damarlardan difüzyonla oksijen ve gıda gereksinimlerini sağlayarak büyüebilmektedirler. Ancak bu hacmi aştıklarında çoğalabilmeleri ve yayılabilmeleri için anjiyogenez gereklidir. Tümör ilişkili anjiyogenez spesifik büyüme faktörlerine, endotel hücre reseptörlerinin aktivasyonuna ve endotel hücrelerinin çoğalma kapasiteleri ile buna hizmet eden hücre dışı matriks komponentlerine bağlıdır (6, 36, 44).

Anjiyogenik etki gösteren) alanlarında arttığı ve invaziv hastalığa dönüşmede önemli rol oynadığı rapor edilmiştir (58). Mesane kanserinde, Theodoropoulos ve arkadaşları, 93 olguda yaptıkları VEGF ile ilgili invaziv ve preinvaziv tümörlerde yapılmış çalışmalar mevcuttur (58). VEGF ifadesindeki artışın, tiroid tümörlerinde ileri evre, over tümörlerinde ise ileri evre ve yüksek mitotik aktivite ile ilişkili olduğu bulunmuştur (10, 11). Memede VEGF ifadesinin, komşu benign epitel ile karşılaştırıldığında duktal karsinoma in situ (DCIS) bir çalışmada, artmış VEGF ifadesinin, anjiyogenezisi uyardığını, invazyon derinliği ve kötü prognozla ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir (68). Xia ve arkadaşları da artmış VEGF ifadesinin, ileri evre ve kas invazyonuyla birlikte olduğunu bulmuşlardır (69). Yüzeysel mesane kanserli olgularda yapılan çalışmalarda, artmış VEGF ifadesinin, artmış tümör invazyon derinliğiyle ilişkisi bildirilmiştir (67, 70). Çalışmamızda, derin tümörlerin yüzeysel tümörlere göre, invaziv tümörlerin invazyon yapmamış tümörlere göre daha fazla VEGF ifade etmeleri ve invazyon derinliği arttıkça VEGF ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olması, diğer çalışmalarla uyumlu olarak, artmış VEGF ifadesinin invaziv tümörlerin bir özelliği olduğunu düşündürmüştür.

Memede yüksek dereceli DCIS'ların ve servikste yüksek dereceli intraepitelyal neoplazilerin, düşük derecelilere göre daha fazla VEGF ifade ettikleri bildirilmiştir (58, 64). Mesane tümörlerinde yapılan çalışmalarda da, yüksek tümör derecesi ile VEGF ifadesindeki artışın uyumlu olduğu gösterilmiştir (68, 70). Yüzeysel mesane kanserli olgularda, tümör derecesi ile VEGF ifadesi arasında anlamlı ilişki bulun ve yüzeysel mesane kanserinin ilerlemesinde ve diferansiyasyon kaybında VEGF'in önemli rol oynadığını bildiren çalışmalar mevcuttur (12, 47, 67). Stavropoulos ve arkadaşları ise, yüzeysel mesane tümörlerinde, VEGF ifadesiyle tümörün derecesi arasında ilişki bulamamışlardır (65). Çalışmamızda, yüksek dereceli tümörlerde, düşük dereceli

tümörlere göre VEGF ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı artışın saptanmış olması, tümörlerdeki artmış VEGF ifadesi ile tümörün diferansiyasyon kaybı arasında pozitif ilişki olduğunu ifade eden çalışmaları desteklemektedir.

Tümörlerin lenf nodu metastazı ile VEGF ifadesi arasındaki ilişkiyi gösteren az sayıda çalışma mevcuttur. Tiroid tümörlerinde, VEGF ifadesi ile lenf nodu metastazı arasında ilişki bulunamamıştır (11). Saintigny ve arkadaşlarının küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde yaptıkları çalışmada, lenf nodu metastazı yapmış olgularda, VEGF-C ve VEGF-R3 ifadelerinin artmış olduğu gösterilmiştir (62). Yang ve arkadaşları, 161 ürotelyal karsinomlu olguda, lenf nodu metastazı olanların, metastazı olmayanlara oranla daha fazla VEGF ifade ettiklerini bulmuşlar ve VEGF'in tümörün büyümesi kadar yayılımında da önemli bir rol oynadığını ileri sürmüşlerdir (70). Çalışmamızda, lenf nodu metastazı olan ve olmayan tümörler arasında VEGF ifadesinde anlamlı bir fark bulunamamıştır. Saintigny ve arkadaşlarından farklı olarak çalışmamızda kullandığımız VEGF tüm tipleri tanımaktadır. Lenf nodu tutulumunda lenfanjiyogenezisin rol oynadığı ve burada da özellikle VEGF-C ve VEGF-D'nin VEGF-R3 üzerinden etkili oldukları düşünülürse, VEGF-C, VEGF-D ve VEGF-R3 ifadesini ayrıca değerlendirmemiş olmamız bu farklılığın nedeni olabilir. Lenf nodu tutulumu olan tümörlerde artmış VEGF ifadesi saptayan Yang ve arkadaşlarının çalışmasından farklı sonuçlar elde etmemizin nedeni de, serimizde lenf nodu olan olgu sayısının azlığı olabilir.

TSP-1 ifadesi ile tümör evresi arasındaki ilişkiyi değerlendiren çalışmalarda farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Tiroid tümörlerinde yapılan çalışmada, TSP-1 ifadesi ile tümör evresi arasında ilişki bulunamamıştır (11). Leiomyosarkomda, evreyle TSP-1 ifadesi arasında bir ilişki bulunamamıştır ancak leiomyom ve leiomyosarkomlar arasında TSP-1 ifadesi karşılaştırıldığında, leiomyomun daha yüksek oranda TSP-1 ifade ettiği bildirilmiştir (9). Ratlarda yapılan çalışmalar, TSP-1'in yeni damar oluşumunu önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir. TSP-1'in modifiye ürünleri insan mesane kanserinde anjiyogenezisi önlemek ve tümör çapını küçültmek için kullanılmıştır (63). Ekstrasellüler immünreaktiviteyi değerlendiren Grossfeld ve arkadaşları, düşük TSP-1 (Mouse anti-TSP monoklonal antikor MAII) ifadesinin, artmış tekrarlanma oranı ve azalmış sağkalımla ilişkili olduğunu, ancak tümör evresi ve invazyon derinliği ile arasında anlamlı bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir (24). Goddard ve arkadaşları da,

yüzeysel mesane kanserlerinde yaptıkları çalışmada, tümör hücrelerinde, stromada, epitelyal stromal bileşkede ve damar çevresinde TSP-1 (monoklonal, Ab-4, Neomarkers, USA, TSP-1'in tip 2 epitopunu bağlıyor) immünreaktivitesini ayrı ayrı değerlendirmişlerdir ve TSP-1 ifadesi ile evre arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır. Ancak kas invazyonuna ilerleyen vakalarda önemli oranda perivasküler TSP-1 ifade kaybı rapor etmişlerdir (22). Ioachim ve arkadaşları da çalışmalarında tümör hücrelerinde, stromada, epitelyal stromal bileşkede ve damar çevresinde TSP-1 (A6.1, DBS) immünreaktivitesini değerlendirmişlerdir, tümör evresi arttıkça stromal TSP-1 ifadesinin azaldığını bulmuşlar ancak tümör hücrelerinde, TSP-1 ifadesi ile tümörün tekrarı ve kas invazyonuna ilerlemesi arasında bir ilişki gösterememişlerdir. Bu sonucun tümör hücrelerince üretilen TSP ürünlerindeki farklılıktan kaynaklandığını ve bulgularının Goddard ve Grossfeld'den farklı olmasını da kullanılan farklı antikora bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir (28). Çalışmamızda, invazyon yapmış tümörlerin invazyon yapmayanlara göre, derin tümörlerin yüzeysel tümörlere göre daha az TSP-1 ifade etmeleri ve invazyon derinliği arttıkça TSP-1 ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olması, TSP-1 ifade kaybının invaziv tümörlerin bir özelliği olduğu görüşünü desteklemektedir. Ioachim, Goddard ve Grossfeld ile sonuçlarımız arasındaki uyumsuzluğun immünohistokimyasal boyama tekniklerindeki farklılıkların ve farklı antikor kullanımlarının neden olabileceği düşünülmektedir.

Ioachim ve arkadaşları, kötü diferansiye tümörlerde, iyi ve orta diferansiye tümörlere göre tümör hücrelerinde daha düşük TSP-1 ifadesi bildirmişlerdir (28). Grossfeld ve Goddard'ın çalışmalarında, TSP-1 ifadesi ile tümör derecesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gösterilememiştir (22, 24). Çalışmamızda, yüksek dereceli tümörlerde düşük dereceli tümörlere göre TSP-1 ifadesinde, istatistiksel olarak anlamlı belirgin azalma olması, TSP-1 ifade kaybıyla, tümörün diferansiyasyon kaybı arasındaki ilişkiyi rapor eden çalışma ile uyumludur. Grossfeld ve Goddard'ın sonuçları ile bulgularımız arasındaki uyumsuzluğun kullanılan farklı antikora ve immünohistokimyasal boyama tekniklerindeki farklılığa bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Tiroid tümörlerinde yapılan çalışmalarda, TSP-1 ifadesi ile lenf nodu metastazı arasında bir ilişki bulunamamıştır (11, 66). Grossfeld ve arkadaşları mesane kanserinde

yaptıkları çalışmalarında TSP-1 ifadesiyle lenf nodu metastazının varlığı arasında bir ilişki gösterememişlerdir (24). Hawighorst ve arkadaşları artmış TSP-1 ifadesinin anjiyogenezi ve uzak metastaz oluşumunu baskıladığını ancak lenfanjiogenezi ve lenf nodu metastazını engellemede yetersiz kaldığını öne sürmüşlerdir. Aynı çalışmada TSP-1'in antianjiyogenik etkisinde önemli rol oynayan, vasküler endotelde bulunan bir reseptör olan CD36'nın lenfatiklerde bulunmadığı gösterilmiştir (25). Çalışmamızda da, lenf nodu tutulumu olan olgularla lenf nodu tutulumu olmayanlar arasında TSP-1 ifadesinde anlamlı bir farklılık saptanamamış olması bu görüşü desteklemektedir.

Matriks metalloproteinazlarının tümörün invaziv davranma potansiyelini belirlemedeki önemini araştırmak üzere yapılan çalışmalarda oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC)'un invaziv davranışının MMP-2 ve MMP-9 ifadesi ile ilişkili olduğu ve agresif tümör hücrelerinin yüksek MMP-9 ifade ettikleri rapor edilmiştir (32). Glioblastoma hücrelerinde de kuvvetli MMP-9 ifadesi bulunmuştur (50). Özdemir ve arkadaşları, invaziv ve invaziv olmayan ürotelyal karsinomlarda yaptıkları çalışmada MMP-9 ifadesini tümörün evresiyle uyumlu bulmuşlardır (50). Papathoma ve arkadaşları da, MMP-9 ifadesinin derin tümörlerde yüzeysel tümörlere göre daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir (51). Durkan ve arkadaşları ise, mesanede tümörün evresi ve derecesi ile MMP-9 ifadesi arasında ilişki bulamamışlardır. Çalışmalarında monoklonal antikora kullanmışlar ve skorlarını yalnızca boyanma şiddetine göre vererek; 0 (boyanma yok), 1 (hafif) ve 2 (orta)'yi negatif kabul ederken yalnızca 3 (kuvvetli) ve 4 (çok kuvvetli)'ü pozitif kabul etmişlerdir (15). Çalışmamızda, derin tümörlerin yüzeysel tümörlere göre ve invaziv tümörlerin invaziv olmayanlara göre daha yüksek MMP-9 ifade etmesi ve invazyon derinliği arttıkça MMP-9 ifadesinin de artmış olması, tümör hücrelerince arttırılan MMP-9 ifadesinin, invaziv tümörlerin bir özelliği olduğunu düşündürmüştür. Durkan ve arkadaşlarının sonuçlarındaki farklılığın ise kullanılan antikora (monoklonal) ya da değerlendirme yöntemlerindeki farklılığa bağlı olabileceği düşünülmüştür. Derin kas ve yüzeysel kas invazyonlu tümörler arasında, VEGF, MMP-9 ve TSP-1 ifadeleri ile ilgili literatürde bir çalışmaya rastlayamadık. Çalışmamızda derin kas ve yüzeysel kas invazyonlu tümörler arasında, VEGF, MMP-9 ve TSP-1 ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

OSCC'lu olgularda yapılan çalışmalar, MMP-9 ifadesi ile tümörün derecesi arasında ilişki bulmuşlardır (14). Mesane tümörlerinde yapılan çalışmalarda da, yüksek dereceli tümörlerin daha yüksek MMP-9 ifade ettiklerini rapor edilmiştir. Çalışmamızda, yüksek dereceli tümörlerin düşük dereceli tümörlere göre daha fazla MMP-9 ifade etmeleri, diğer çalışmalarla uyumlu olarak, tümörün diferansiyasyon kaybının MMP-9 ifadesindeki artışla ilişkili olduğu görüşünü desteklemektedir (13, 14, 50, 51).

Vicente ve arkadaşları, OSCC'lu olgularda yaptıkları çalışmada, lenf nodu metastazı olan tümörlerde, MMP-9 ve MMP-2 ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmadığını belirtmişlerdir (14). Riedel ve arkadaşları da, oral, orofarinks, hipofarinks ve larinks lokalizasyonlu skuamöz hücreli karsinomlu olgularda MMP-9 ifadesini, lenf nodu tutulumuyla ilişkili bulmazken yaşam süresinin kısalığı ile ilişkili bulmuşlardır (59). Katayama ve arkadaşları, 53 OSCC'da MMP-9 ifadesini lenf nodu metastazı, uzak organ metastazı ve kötü prognozla korele bulmuşlardır (33). Yaptığımız literatür araştırmasında lenf noduna metastaz yapmış mesane tümörlerinde MMP-9 ifadesi ile ilgili bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmamızda, lenf nodu tutulumu olan olgular ile olmayanlar arasında MMP-9 ifadesi yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanamamıştır. Sonuçlar, MMP-9'un, tümörlerin lenf nodu metastazı yapmasında etkili rol oynamadığını düşündürmüştür. Ancak lenf nodu tutulumuyla MMP-9 ifade artışı arasında ilişki bulan Katayama ve arkadaşlarından farklı sonuçlar elde etmemizin, bizim serimizde lenf nodu olan olgu sayısındaki azlığın neden olabileceği de akılda bulundurulmalıdır.

TSP-1'in ekstrasellüler depolardan VEGF salınımının düzenlenmesine katkıda bulunduğu ve VEGF artışının TSP-1 yoksun tümörlerde ortaya çıktığı rapor edilmiştir (60). Farklı tümörlerde anjiyogenezisi tanımlamak için VEGF ve TSP-1 ifadelerinin düzeyleri kullanılmıştır. Yine aynı çalışmada tümör hücrelerindeki yüksek TSP-1 ifadesi ile düşük VEGF ifadesinin kolanjiokarsinomda zayıf vaskülarizasyonda rol oynadığı bildirilmiştir (60). Tiroid kanserlerinde, mikrodamar sayısının, VEGF ifadesi ile pozitif, TSP-1 ifadesi ile ise negatif ilişki gösterdiği rapor edilmiştir. Ancak VEGF ile TSP-1 ifadesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (66). Çalışmamızda da, VEGF ile TSP-1 ifadeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir

ilişki bulunamamıştır. Sonuçlar, VEGF ve TSP-1'in birbirlerinden bağımsız mekanizmalar üzerinden etkili olduklarını düşündürmektedir.

Yüksek seviyede aktif MMP-9'un tümör yayılımını ve anjiyogenezisi uyardığı ve bunu matriksten endotelial büyüme faktörünün salınımını artırarak yaptığı rapor edilmiştir (7, 60). Çalışmamızda saptanan VEGF ile MMP-9 ifadeleri arasında, istatistiksel olarak anlamlı, pozitif ilişki, VEGF ve MMP-9'un tümörlerde, aynı yönde, birbirleri ile ilişkili roller oynadıklarını düşündürmektedir.

Farelerde meme tümörlerinde yapılan deneysel çalışmada, TSP-1 ifadesinin azlığı ve aşırı ifadesi oluşturulmuş, TSP-1'in azlığında aktif MMP-9 seviyelerinin yükseldiğini ve bunun da tümördeki invaziv fenotipi, hızlı büyümeyi ve vaskülerite artışını açıkladığı rapor edilmiştir. TSP-1 aşırı ifadesinde ise ProMMP-9'un enzimatik aktivasyonunun TSP-1 tarafından baskılandığı gösterilmiştir (60). Çalışmamızda saptanan MMP-9 ile TSP-1 ifadeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı, negatif ilişki, MMP-9 ile TSP-1'in tümörlerde, farklı yönde ancak birbirleri ile ilişkili roller oynadıklarını düşündürmektedir.

Literatür ışığında değerlendirdiğimiz bulgularımız, mesane karsinomunun invazyon ve diferansiasyonunda belirgin rol oynayan anjiyogenik etkili VEGF ve MMP-9 ile antianjiyogenik etkili TSP-1'in tümör davranışını belirlemede faydalı olacağını düşündürmüş olup, tümör hücrelerinin yaşamını sürdürmesini ve yayılmasını engelleme prensibine dayanan antianjiyogenik tedavilerin mesane karsinomlarında yakın bir gelecekte kullanılabileceği yönünde umut vermiştir.

6- SONUÇLAR

- 1- Ürotelyal karsinomda, yüksek dereceli tümörlerde, düşük dereceli tümörlere göre VEGF ifadesi artmaktadır.
- 2- İnvazyon derinliği arttıkça VEGF ifadesi artmaktadır.
- 3- İnvazyon yapmış tümörlerde, invazyon yapmamış tümörlere göre VEGF ifadesi artmaktadır.
- 4- Derin tümörlerde, yüzeysel tümörlere göre VEGF ifadesi artmaktadır.
- 5- Yüksek dereceli tümörlerde, düşük dereceli tümörlere göre MMP-9 ifadesi artmaktadır.
- 6- İnvazyon derinliği arttıkça MMP-9 ifadesi artmaktadır.
- 7- İnvazyon yapmış tümörlerde, invazyon yapmamış tümörlere göre MMP-9 ifadesi artmaktadır.
- 8- Derin tümörlerde, yüzeysel tümörlere göre MMP-9 ifadesi artmaktadır.
- 9- Yüksek dereceli tümörlerde, düşük dereceli tümörlere göre TSP-1 ifadesi azalmaktadır.
- 10- İnvazyon derinliği arttıkça TSP-1 ifadesi azalmaktadır.
- 11- İnvazyon yapmış tümörlerde, invazyon yapmamış tümörlere göre TSP-1 ifadesi azalmaktadır.
- 12- Derin tümörlerde, yüzeysel tümörlere göre TSP-1 ifadesi azalmaktadır.
- 13- Derin ve yüzeysel kas invazyonlu tümörler arasında, VEGF, MMP-9 ve TSP-1 ifadesinde anlamlı bir fark yoktur.
- 14- VEGF ile MMP-9 arasında istatistiksel olarak anlamlı, pozitif ilişki mevcuttur.
- 15- TSP-1 ile MMP-9 arasında istatistiksel olarak anlamlı, negatif ilişki mevcuttur.
- 16- VEGF ile TSP-1 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki mevcut değildir.
- 17- Lenf nodu tutulumu olan ve olmayan tümörler arasında, VEGF, MMP-9 ve TSP-1 ifadesinde anlamlı bir fark yoktur.

7- KAYNAKLAR

1. Amin MB. The Latest in Urinary Bladder Biopsy Interpretation. In: CAP'05- The Pathologists' Meeting. Chicago, 2005; 1-41.
2. Amin MB, Murphy WM, Reuter VE, et al. A symposium on controversies in the pathology of transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *Anat Pathol* 1996; 1: 1-39.
3. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, et al. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis. *Int J Cancer* 1997; 72: 1-22.
4. Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 1977; 14: 53-65.
5. Bates D, Hillman N, Williams B, et al. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat* 2002; 200(6): 581-597.
6. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6): 401-410.
7. Bergers G, Brekken R, McMahon G, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000; 2(10): 737-744.
8. Bochner BH, Nichols PW, Skinner DG. Overstaging of transitional cell carcinoma: clinical significance of lamina propria fat within the urinary bladder. *Urology* 1995; 45(3): 528-531.
9. Bodner-Adler B, Nather A, Bodner K, et al. Expression of thrombospondin 1 (TSP 1) in patients with uterine smooth muscle tumors: an immunohistochemical study. *Gynecol Oncol* 2006; 103(1): 186-189.

10. Brustmann H, Naude S. Vascular endothelial growth factor expression in serous ovarian carcinoma: relationship with high mitotic activity and high FIGO stage. *Gynecol Oncol* 2002; 84(1): 47-52.
11. Bunone G, Vigneri P, Mariani L, et al. Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. *Am J Pathol* 1999; 155: 1967-1976.
12. Chow NH, Liu HS, Chan SH, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in primary superficial bladder cancer. *Anticancer Res* 1999; 19(5C): 4593-4597.
13. Davies B, Waxman J, Wasan H, et al. Levels of matrix metalloproteinases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Cancer Res* 1993; 53(22): 5365-5369.
14. De Vicente JC, Fresno MF, Villalain L, et al. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005; 41(3): 283-293.
15. Durkan GC, Nutt JE, Marsh C. Alteration in urinary matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio predicts recurrence in nonmuscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9(7): 2576-2582.
16. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146(5): 1029-1039.
17. Ebstein JI. The lower urinary tract and male genital system. Ch: 21 In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N (ed.) *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease (7th ed)*. China, Elsevier Saunders, 2005; 1023-1058.

18. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology vascular endothelial growth factor. *Endocrin Rev* 1997; 18: 4-25.
19. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676.
20. Ferrara N. VEGF: An update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11: 517-524.
21. Foda HD, Zucker S. Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *Drug Discov Today* 2001; 6(9): 478-482.
22. Goddard JC, Sutton CD, Jones JL, et al. Reduced Thrombospondin-1 at presentation predicts disease progression in superficial bladder cancer. *Eur Urol* 2002; 42: 464-468.
23. Gronau S, Menz CK, Melzner I, et al. Immunohistomorphologic and molecular cytogenetic analysis of a carcinosarcoma of the urinary bladder. *Virchows Arch* 2002; 440(4): 436-440.
24. Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP, et al. Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 219-227.
25. Hawighorst T, Oura H, Streit M, et al. Thrombospondin-1 selectively inhibits early-stage carcinogenesis and angiogenesis but not tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in transgenic mice. *Oncogene* 2002; 21(52): 7945-7956.
26. Holmang S, Hedelin H, Anderstrom C, et al. Recurrence and progression in low grade papillary urothelial tumors. *J Urol* 1999; 162: 702-707.
27. Holmang S, Johansson SL. The nested variant of transitional cell carcinoma-a rare neoplasm with poor prognosis. *Scand J Urol Nephrol* 2001; 35(2): 102-105.

28. Ioachim E, Michael MC, Salmas M, et al. Thrombospondin-1 expression in urothelial carcinoma: prognostic significance and association with p53 alterations, tumour angiogenesis and extracellular matrix components. *BMC Cancer* 2006; 6:140-147.
29. Johansson SL, Borghede G, Holmang S. Micropapillary bladder carcinoma: a clinicopathological study of 20 cases. *J Urol* 1999; 161(6): 1798-1802.
30. Johansson SL, Busch C. Non-invasive papillary urothelial carcinoma, low grade. In: Eble NJ, Sauter G, Epstein JI, et al. *World Health Organization Classification of Tumours, Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. France, Lyon, 2004; 116-117.
31. John A, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res* 2001; 7(1): 14-23.
32. Juarez J, Clayman G, Nakajima M, et al. Role and regulation of expression of 92-kDa type-IV collagenase (MMP-9) in 2 invasive squamous-cell-carcinoma cell lines of the oral cavity. *Int J Cancer* 1993; 55(1): 10-18.
33. Katayama A, Bando N, Kishibe K, et al. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. *Clin Cancer Res* 2004; 10(2): 634-640.
34. Klagsbrun M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7: 259-270.
35. Kliche S, Waltenberger J. VEGF receptor signaling and endothelial function. *JUBMB Life* 2001; 52(1-2): 61-66.
36. Konukoğlu D, Turhan SM. Molecular basis of angiogenesis mechanisms and tumor angiogenesis. *Cerrahpaşa J Med* 2005; 36: 42-48.

37. Laka PK, Chakraborty C. Role of Nitric oxide in carcinogenesis and tumor progression. *Lancet Oncol* 2001; 2: 149-155.
38. Lopez-Beltran A, Pacelli A, Rothenberg HJ, et al. Carcinosarcoma and sarcomatoid carcinoma of the bladder: clinicopathological study of 41 cases. *J Urol* 1998; 159(5): 1497-1503.
39. Lopez-Beltran A, Sauter G, Gasser T, et al. Infiltrating urothelial carcinoma. In: Eble NJ, Sauter G, Epstein JI, et al. *World Health Organization Classification of Tumours, Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. France, Lyon, 2004; 90-109.
40. Lopez JI, Elorriaga K, Imaz I, et al. Micropapillary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Histopathology* 1999; 34(6): 561-562.
41. Maranchie JK, Bouyounes BT, Zhang PL, et al. Clinical and pathological characteristics of micropapillary transitional cell carcinoma: a highly aggressive variant. *J Urol* 2000; 163(3): 748-751.
42. Martin JE, Jenkins BJ, Zuk RJ, et al. Clinical importance of squamous metaplasia in invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *J Clin Pathol* 1989; 42(3): 250-253.
43. McColl BK, Stacker SA, Achen MG. Molecular regulation of the VEGF family-inducers of angiogenesis and lymphangiogenesis. *APMIS* 2004; 112: 463-480.
44. McNamara DA, Harmey JH, Walsh TN, et al. Significance of angiogenesis in cancer therapy. *Br J Surg* 1998; 85: 1044-1055.
45. Mentlein R, Held-Feindt J. Angiogenesis factors in gliomas: a new key to tumour therapy? *Naturwissenschaften* 2003; 90: 385-394.

46. Messing EM. Urothelial tumors of the urinary tract. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ (ed) Campbell's Urology (8th ed). Vol. 4. Philadelphia, Elsevier, 2002; 2732–2784.
47. Ogura Y, Sato K, Kato T, et al. Immunohistochemical analysis of expression of angiogenic factors and tumor angiogenesis in superficial bladder cancer. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1998; 89(5): 529-537.
48. Oliva E, Amin MB, Jimenez R, et al. Clear cell carcinoma of the urinary bladder: a report and comparison of four tumors of mullerian origin and nine of probable urothelial origin with discussion of histogenesis and diagnostic problems. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(2): 190-197.
49. Omeroglu A, Paner GP, Wojcik EM, et al. Carcinosarcoma/sarcomatoid carcinoma arising in a urinary bladder diverticulum. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126(7): 853-855.
50. Ozdemir E, Kakehi Y, Okuno H, et al. Role of matrix metalloproteinase-9 in the basement membrane destruction of superficial urothelial carcinomas. *J Urol* 1999; 161(4): 1359-1363.
51. Papatoma AS, Petraki C, Grigorakis A, et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in bladder cancer. *Anticancer Res* 2000; 20(3B): 2009-2013.
52. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2): 74-108.
53. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 80: 827-841.
54. Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, et al. Bladder cancer: epidemiology, diagnosis and management. *Cancer Pract* 2002; 10(6): 311-322.

55. Reuter VE. Non-invasive papillary urothelial carcinoma, high grade. In: Eble NJ, Sauter G, Epstein JI, et al. World Health Organization Classification of Tumours, Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. France, Lyon, 2004; 117-118.
56. Reuter VE. Urinary Bladder, Ureter and Renal Pelvis. In: Sternberg S. S. (ed) Histology for Pathologists (2nd ed). New York, Lippincott-Raven, 1997; 835-847.
57. Ria R, Roccaro AM, Merchionne F, et al. Vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma. *Leukemia* 2003; 17: 1961-1966.
58. Rice A, Quinn CM. Angiogenesis, thrombospondin, and ductal carcinoma in situ of the breast. *J Clin Pathol* 2002; 55(8): 569-574.
59. Riedel F, Götte K, Schwalb J, et al. Expression of 92-kDa type IV collagenase correlates with angiogenic markers and poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2000; 17: 1099-1105.
60. Rodriguez-Manzaneque JC, Lane TF, Ortega MA, et al. Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(22): 12485-12490.
61. Ordonez NG, Rosai J. Kidney, Renal, Pelvis and Ureter, Bladder. In: Rosai J. Rosai and Ackerman's. Surgical Pathology (9nd ed). Volum 1. China, Elsevier, 2004: 1317-1359.
62. Saintigny P, Kambouchner M, Ly M, et al. Vascular endothelial growth factor-C and its receptor VEGFR-3 in non-small-cell lung cancer: Concurrent expression in cancer cells from primary tumour and metastatic lymph node. *Lung Cancer* 2007; 58(2): 205-213.

63. Sargiannidou I, Qiu C, Tuszynski GP. Mechanisms of Thrombospondin-1 Mediated Metastasis and Angiogenesis. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 127-136.
64. Smith-McCune KK, Weidner N. Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. *Cancer Res* 1994; 54: 800-804.
65. Stavropoulos NE, Bouropoulos C, Ioachim IE, et al. Prognostic significance of angiogenesis in superficial bladder cancer. *Int Urol Nephrol* 2004; 36(2): 163-167.
66. Tanaka K, Sonoo H, Kurebayashi J, et al. Inhibition of infiltration and angiogenesis by thrombospondin-1 in papillary thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8(5): 1125-1131.
67. Theodoropoulos VE, Lazaris AC, Kastriotis I, et al. Evaluation of hypoxia-inducible factor 1alpha overexpression as a predictor of tumour recurrence and progression in superficial urothelial bladder carcinoma. *BJU International* 2005; 95(3): 425-431.
68. Theodoropoulos VE, Lazaris AC, Sofras F, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha expression correlates with angiogenesis and unfavorable prognosis in bladder cancer. *European Urology* 2004; 46(2): 200-208.
69. Xia G, Kumar SR, Hawes D, et al. Expression and significance of vascular endothelial growth factor receptor 2 in bladder cancer. *J Urol* 2006; 175(4): 1245-1252.
70. Yang CC, Chu KC, Yeh WM. The expression of vascular endothelial growth factor in transitional cell carcinoma of urinary bladder is correlated with cancer progression. *Urol oncol* 2004; 22: 1-6.