

**T.C**  
**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**Patoloji Anabilim Dalı**

**MESANE ÜROTELİYAL NEOPLAZİLERİNDE**  
**D2-40 İLE SAPTANAN LENFATİK DAMAR YOĞUNLUĞUNUN VE**  
**LENFATİK ENDOTELİYAL BÜYÜME FAKTÖRLERİNİN**  
**(VEGF-C ve VEGF-D) EKSPRESYONUNUN**  
**KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**  
**Dr. Arzu ÖZDAMAR**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Doç. Dr. Nalân NEŞE**

**Manisa, 2011**

**T.C**  
**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**Patoloji Anabilim Dalı**

**MESANE ÜROTELİYAL NEOPLAZİLERİNDE**  
**D2-40 İLE SAPTANAN LENFATİK DAMAR YOĞUNLUĞUNUN VE**  
**LENFATİK ENDOTELİYAL BÜYÜME FAKTÖRLERİNİN**  
**(VEGF-C ve VEGF-D) EKSPRESYONUNUN**  
**KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**  
**Dr. Arzu ÖZDAMAR**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Doç. Dr. Nalân NEŞE**

**Manisa, 2011**

## TEŐEKKÜR

Patoloji eğitimim ve tez hazırlığım boyunca bilgi ve deneyimini benden esirgemeyen sevgili tez danıőmanım Doç. Dr. Nâlan Neşe'ye, uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren sayın hocalarım Prof. Dr. Aydın İőisađ'a, Prof. Dr. Ali Rıza Kandilođlu'na, Doç. Dr. Semin Ayhan'a ve Doç. Dr. Peyker Temiz'e, birlikte çalıőmaktan büyük zevk aldığım asistan arkadaşlarıma, patoloji laboratuvarında görevli tüm teknisyen ve arőiv görevlisi arkadaşlarıma ayrıca her zaman desteklerini yanımda hissettiğim sevgili eőime ve canım oğluma, hayatımda varlıklarıyla bana güç veren aileme teőekkürlerimi sunarım.

**Dr. Arzu Özdamar**

## İÇİNDEKİLER

I.	GİRİŞ.....	1
II.	GENEL BİLGİLER .....	2
	1. Mesanenin Embriyolojisi .....	2
	2. Mesanenin Anatomisi.....	3
	3. Mesanenin Histolojisi .....	4
	4. Üroteliyal Karsinom.....	5
	5. Lenfanjiogenezis .....	22
	6. Tümör ve Lenfanjiogenezis .....	23
	7. D2-40 .....	24
	8. VEGF Ailesi .....	26
	9. VEGF-C .....	27
	10. VEGF-D.....	29
III.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
IV.	BULGULAR .....	37
V.	TARTIŞMA .....	62
VI.	SONUÇ VE ÖNERİLER .....	68
VII.	ÖZET .....	71
VIII.	İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT).....	72
IX.	KAYNAKLAR.....	74

## KISALTMALAR

LDY	Lenfatik damar yoğunluğu
VEGF	Vasküler endotelial büyüme (growth) faktör
VEGF-C	Vasküler endotelial büyüme (growth) faktör-C
VEGF-D	Vasküler endotelial büyüme (growth) faktör-D
ÜK	Üroteliyal Karsinom
DMPPÜN	Düşük Malignite Potansiyelli Papiller Üroteliyal Neoplazi
CİS	Karsinoma İn-Situ
DDPÜK	Düşük Dereceli Papiller Üroteliyal Karsinom
YDPÜK	Yüksek Dereceli Papiller Üroteliyal Karsinom
TUR	Trans Üretral Rezeksiyon
LP	Lamina Propria
MP	Muskularis Propria
PÜN	Papiller Üroteliyal Neoplazi
WHO/ISUP	Dünya Sağlık Örgütü/Uluslararası Üropatologları Birliği
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
BBSHK	Baş-Boyun Skuamöz Hücreli Karsinomları
HE	Hematoksilen&Eozin
TBS	Tris Tampon Solüsyonu
PUNLMP	Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential
LGPUC	Low Grade Papillary Urothelial Carcinoma
HGPUC	High Grade Papillary Urothelial Carcinoma
LVD	Lymphatic Vessel Density

## GİRİŞ

Mesane kanserleri tüm dünyada yedinci en sık görülen kanserdir ve ürogenital bölgenin ikinci en sık malign tümörüdür. Mesane kanserlerinin de %90'dan fazlası üroteliyal karsinomlardır (ÜK). Mesane ÜK'leri klinik olarak tanındığında %70-80 oranında non-invaziv ya da erken invaziv (Ta, Tis veya T1) evrededir ve genellikle TUR ile tedavi edilirler. Ancak yüzeysel tümörler ve invaziv tümörler başlangıç tedaviden sonra nüks edebilirler ve bu tümörler için nüksün ve progresyonun öngörülebilmesi hastalığın prognozunu belirlemektedir. Mesane tümörlerinde tümör büyümesi, nüksü, progresyonu ve sağkalım ile ilişkili çeşitli büyüme faktörleri ve moleküller bildirilmiştir. Bu faktörlere göre, mikrodamar yoğunluğu mesane kanserleri için önemli prognostik belirleyici haline gelmiştir. Ancak lenfanjiogenezisin ve lenfatik damar yoğunluğunun (LDY) mesane kanserindeki klinik ve patolojik önemi henüz net değildir. Lenfanjiogenezisin malign tümörlerin lenf nodu metastazı ve progresyonunda rolü olduğu düşünülmektedir ve son yıllarda diğer bütün organlarda olduğu gibi mesanede de lenfanjiogenezis üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarda, lenfatik damar için spesifik bir belirleyici olan D2-40 ile LDY ölçülmekte ve lenfanjiogenezisin düzenleyicileri olan vasküler endotelial büyüme faktörü-C ve D'nin (VEGF-C ve VEGF-D) ekspresyonları araştırılmaktadır. Bu büyüme faktörlerinin düzenlediği lenfanjiogenezisin çeşitli tedavi yöntemleri ile inhibe edilmesinin tümörün nüks ve progresyonunu azaltacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada lenfanjiogenezisin mesane üroteliyal neoplazilerinde klinikopatolojik parametrelerle ilişkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

## GENEL BİLGİLER

### MESANE

#### Mesanenin Embriyolojisi

Gelişimin 4. ve 7. haftalarında, ürorektal septum kloakayı anorektal kanal ve primitif ürogenital sinüse böler. Kloakal membranın kendisi de, önde ürogenital membran, arkada da anal membran kalacak şekilde ikiye bölünür. Primitif ürogenital sinüs üç kısımdan meydana gelir:

1- Üst ve en büyük parça mesanedir. Başlangıçta mesane allantoisle ilişkidir. Allantoisin oblitere olmasının ardından geride mesanenin tepesini göbeğe bağlayan urakus adı verilen fibröz bir kordon kalır. Erişkinlerde bu ligament median umbilikal ligament olarak bilinir.

2- Bir sonraki parça erkeklerde üretranın prostatik ve membranöz parçalarının geliştiği nispeten daha dar bir kanal halindeki, ürogenital sinüsün pelvik parçasıdır.

3- Son parça da ürogenital sinüsün fallik parçası olarak bilinen kalıcı ürogenital sinüstür. Bu parça dıştan ürogenital membranla ayrılan yassılaştırmış bir yapıdır.

Kloakanın bölünmesi sırasında, mezonefrik kanalların kaudal kısımları mesane duvarı içine doğru emilir. Sonuçta başlangıçta mezonefrik kanalların birer çıkıntısı halindeki üreterler, mesaneye ayrı ayrı girer. Böbreklerin yukarı doğru yükselişinin bir sonucu olarak üreter orifisleri de yukarı doğru kayar. Mezonefrik kanal orifisleri de prostatik üretraya açılmak üzere birbirlerine yaklaşırlar. Ve erkeklerde ejakülatuar kanalları meydana getirirler(1).

Mesane ve üretra epiteli ürogenital sinüsün endoderminden köken alır. Lamina propria, muskularis propria ve adventisya splenik mezenşimden

gelişir. Erken embriyolojik gelişme sırasında mezonefrik kanalın kaudal kısmı trigon mukozasının şekillenmesine katkıda bulunur fakat sonunda yerini endoderm alır. Renal pelvis ve üreterler mezodermden köken alırlar (1,2).

### **Mesanein Anatomisi**

Mesane, bebeklerde ve çocuklarda abdomen, erişkinlerde ise pelvis minör yerleşimli, ters piramid şeklinde bir organdır (1,3). Bir süperior (kubbe), bir inferior (taban) ve iki inferolateral olmak üzere dört yüzeyi vardır.

Süperior yüzey pelvik parietal peritonla kaplıdır. Posterior yüzey, erkeklerde vezikula seminalisler ve vas deferenslerin ampullası ile; kadınlarda ise uterin serviks ve vajinanın proksimal bölümü ile rektumdan ayrılır. Bu posterior anatomik ilişkiler klinik olarak oldukça önemlidir. Çünkü mesane tümörlerinin büyük bir bölümü üreteral orifislere komşu posterior duvarda gelişir ve invaziv tümörler komşu yumuşak doku ve organlara uzanabilirler. Erkeklerdeki mesane karsinomlarında prostatik stromal tutulum ve vezikula seminalis tutulumu kötü prognoza işaret eder. Inferolateral yüzeyler levator ani kaslarına komşudurlar. Süperior yüzey ve inferolateral yüzeylerin birleşme alanına (apeks) median umbilikal ligament yapışır. Bu alanda urokal karsinomlar görülür.

Mesanein en distal bölümü olan ve internal sfinkteri içeren mesane boynu üretraya açılır. Posteriorunda erkeklerde rektum, kadınlarda vajina; anteriorunda ve lateralinde ise internal obturator ve levator ani kasları, pubik kemikler ile komşudur.

Mesanein kanlanması internal iliak arterlerin dalları olan inferior vezikal arterler ile kısmen de umbilikal arterler, süperior vezikal arterler, obturator ve inferior gluteal arterler ile kadınlarda uterin ve vajinal arterlerle sağlanır. Venleri internal iliak venlere, lenfatikleri de eksternal ve internal iliak lenf nodlarına drene olurlar (2,3).

Miksiyondan sorumlu vezikal sinir pleksusu T11-L2 sinirlerinden gelen sempatik ve S2-4 sinirlerinden gelen parasempatik dallardan oluşur. Mesane



dolunca ağrıya yol açan duyuşsal sinirler de pelvik ve hipogaştrik sinirlerden gelir (2).

### **Mesaneinin Histolojisi**

Mesane duvarı dört tabakadan oluşmaktadır. a) epitel (ürotelyum), b) lamina propria, c) muskularis propria ve d) adventisya (seroza). Yerleşim yerine bağılı olarak bu tabakalar perivesikal yağ dokusu ile çevrili olabilir. Ürotelyumun kalınlığı ve epitelyal hücrelerin şekilleri mesaneinin doluluğına bağılı olarak değışebilir. Boş bir mesanede epitelyum yedi hücre tabakalı olabilir. Ürotelyum, bazal, intermediate ve yüzeyel olmak üzere 3 tabakadan oluşur. En derindeki (bazal) hücreler kuboidal ya da kolumnar şekillidir. Bunun üzerindeki intermediate tabakadaki hücreler daha çok polihedraldir. Yüzeydeki hücreler sıklıkla şemsiye hücreleri olarak da adlandırılır. Bu hücreler, geniş veya ovoid, yuvarlak nükleuslu, eosinofilik sitoplazmalı olup bazılarında iki nükleolus bulunabilir (2,3).

İnce bir bazal membran, ürotelyumu altındaki lamina propriadan ayırır. Lamina propria zengin vasküler ağına sahip, lenfatik kanallar, sinir sonlanmaları ve elastik fiberler içeren bağ dokudan oluşur. Lamina propriada yağ dokusuna rastlanabilir (2,3). Lamina proprianın kalınlığı mesaneinin boş ve dolu oluşuna göre değışmektedir. Süperfisial lamina propriada düz kas demetleri bulunabilir. Bu demetlerin düzenli ve kesintisiz şekil almasıyla muskularis mukoza oluşur (2). Bu demetleri muskularis propriadan ayırt etmek gerekir. Çünkü bu, tümör evre ve tedavisi için yalnız sonuçlara neden olabilir (2,4).

Muskularis propria sınırları net seçilemeyen iç ve dış longitudinal ve orta sirküler kas tabakasından oluşur (2-3). Muskularis propria mesane boynunda, erkekte prostatın fibromusküler dokusuyla, kadında ise üretra duvarının kas demetleri ile devam eder. En dış tabaka adventisya, bir bağ dokusudur. Mesaneinin yalnızca üst yüzeyi pelvik peritonun serozası ile kaplıdır (2-4).

## ÜROTELİYAL KARSİNOM

### Epidemiyoloji

Üroteliyal karsinomlar (ÜK) dünya genelinde yedinci en sık görülen tümördür ve mesanenin tüm primer tümörlerinin ise %90'ını oluşturur. ÜK'lerin genellikle çoğu 50 yaşın üstündeki hastalarda görülürse de genç erişkinlerde ve çocuklarda da bildirilmiştir (3-6). Bu ikinci grup tümörler sıklıkla daha düşük derecelidirler (4). Erkek/kadın oranı 3.5/1'dir (3,5,6). Beyaz ırkta diğer ırklara göre yaygındır (4).

### Etiyoloji

Ailesel mesane kanseri rapor edilmiş olmakla birlikte mesane kanserlerinin büyük çoğunluğundan çevresel faktörler sorumludur (4-6).

#### *Sigara içimi*

Sigara günümüzde tüm mesane kanserlerinin %30-50'sinden sorumludur ve mesane kanseri riskini 2-3 kat artırır. Sigara içicilik süresi ve mesane kanseri riski arasında doğrudan bir ilişki vardır. 20 yıl sonunda risk 2 kat, 40 yıl sonunda 5 kat artar (8). Mesane kanserlerinin yaklaşık erkeklerde %66'sı, kadınlarda %30'u sigaradan kaynaklanmaktadır (6). Sigara kimyasal karsinojenler ve reaktif oksijen türevlerinden zengin olmakla birlikte, mesane kanserine yol açan özgül karsinojen faktörler tam olarak belirlenememiştir. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler, N-nitrozo bileşikleri ve ansature aldehitler sigarada bulunan potansiyel karsinojenlerdir. Sigara dumanının derin inhalasyonu mesane kanseri riskini artırır (7). Auerbach ve ark. sigara içme alışkanlığı ile değişici epitelde nükleer atipi olması arasında korelasyon saptamışlardır (4,8).

### *Mesleki ve çevresel etkenlere maruz kalma*

Kanserojen etkili kimyasallara maruz kalma ve mesane kanseri gelişimi arasındaki ilişki ilk kez 1895 yılında Rehn tarafından ortaya atılmıştır. Alüminyum, boya, tekstil, petrol ve lastik endüstrilerinde kullanılan 4-aminobifenil, 2-naftilamin, benzidin, 2-kloro-anilin ve ortotolidin insanlar için kanserojen özellik taşımaktadır. Mesane tümörlerinin yaklaşık %25-30'unun endüstriyel karsinojenlere maruz kalma sonucu geliştiği tahmin edilmektedir (6,7).

Schistosoma hematobium'un da mesanenin ÜK ve skuamöz hücreli karsinomu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (3,4-6). İnsan Papillom Virüsünün (HPV) rolü tartışmalı olmakla birlikte şu anki bulgular ÜK'ün ortaya çıkmasında çok da etkili olmadığı yönündedir (4).

Kahve içme alışkanlığının bir risk faktörü olduğu iddia edilmişse de güvenilir kanıtlar elde edilememiştir. Yapay tatlandırıcılar ve diğer gıda maddeleri için de aynı durum söz konusudur (6,7). Ayrıca düzenli olarak saç boyası kullanan kadınlarda, göreceli olarak mesane kanseri riskinin artmış olduğu, özellikle zayıf asetilleyicilerde risk artışının daha da çarpıcı olduğu rapor edilmiştir (7). Medikal ilaçlardan siklofosfamidin içeriğindeki akrolein, akut mesane toksisitesinden sorumludur (6,7).

Arsenik içeriği yüksek olan içme suyu, deride ve bir çok organda kanser oluşturabildiği gibi mesanede de kanser oluşturabilir (6,7).

### **Klinik Bulgular**

#### *Semptomlar*

En sık klinik bulgular, makroskopik/mikroskopik hematüri ve üriner sistem enfeksiyonu bulgularıdır (4-6). Yüksek dereceli tümörlerde olasılıkla mesane duvarının tutulumuna bağlı dizüri görülebilir (4). Nadiren hastalar, palpabl pelvik kitle ve alt ekstremitede ödem ile başvururlar (6). Tümör üreteral orifisi tutarsa hidronefrozla sonuçlanabilir ve bu da kötü prognostik gidişin sinyalidir (4,6).

### *Makroskopi*

ÜK'lerin mesane içinde en sık görüldükleri yer lateral duvarlar ve mesane tabanıdır (4,6). Divertikül içinde, liyofilize dura yaması üzerindeki rejenere ürotelyal epitelde, gastroplasti sonrası oluşan gastrik kalıntılarda da dahil olmak üzere mesanenin her yerinde görülebilirler (4). Tek bir odakta (%75) ya da multipl olabilirler (6). Büyüme paternleri ekzofitik ve/veya endofitiktir. Ekzofitik ÜK'ler, papiller ya da solid (nodüler) görülebilirler (3-4,6).

### **Genetik özellikler**

ÜK'ler, tanımlanmış birkaç olgu dışında ailesel geçiş göstermemektedir. Birkaç epidemiyolojik çalışmada ÜK'li olguların birinci dereceden akrabalarında tümör görülme riskinin 1.5-2 kat arttığı gösterilmiştir. ÜK'lerin heterojen yapısı ve aynı histolojik özelliklere sahip tümörlerin farklı klinik seyir göstermesi ve düşük dereceli tümörlerin yüksek dereceli tümörlere progresyonu nedeniyle ÜK'lerde malignite sürecinde karsinojenik olayları başlatacak kromozomal anormallikler, onkogenler ve tümör süpresör genlerin rolü araştırılmaktadır (6-9).

### *Kromozomal anormallikler*

Genetik faktörlerin hiçbirisi spesifik olmamakla birlikte sıklıkla 2q, 5q, 8p, 9p, 9q, 10q, 11p, 18q ve Y kromozomlarında kayıplar ve 1q, 5p, 8q ve 17q kromozomlarında sitogenetik değişiklikler söz konusudur (6).

### *Protoonkogenler/onkogenler*

*HER-2/neu* transmembran glikoprotein olup ligand bağımsız bir tirozin kinaz aktivitesi oluşturarak hücre çoğalmasını sağlar. *HER-2*'nin invaziv mesane karsinomlarının %10-20'sinde gen amplifikasyonu, %10-50'sinde *overekspresyonu* tanımlanmıştır. Mesane kanseri olgularında *HER-2/neu* ekspresyonu düzeyinin yükseldiği, ekspresyon ve ileri tümör evresi, tümör progresyonu, metastatik hastalık gelişimi ve yaşam süresinde azalma

arasında ilişki bilinmektedir. Ancak bunların tersini söyleyen çalışmalarda vardır (6,9).

*H-ras* genindeki mutasyonlar, mesane kanseri gelişimi ve progresyonla ilişkilidir. Ras onkogeni kodon 12, 13 ve 61 mutasyonları mesane kanserli olguların %45'inde rapor edilmiştir (6,9).

*Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)*, epidermal büyüme faktörü ile aktive olan bir transmembran glikoproteindir. İnvaziv ÜK'lerde, EGFR amplifikasyonu .%3-5, overekspresyonu %30-50'dir (6,9).

*Siklin dependent kinazlar*, ve siklinlerin diğer subünitleri hücre siklusunda önemli rol oynarlar. Siklin D1 geni 11q13' de lokalizedir. ÜK'lerin %10-20'sinde gen amplifikasyonu, %30-50'sinde overekspresyonu tanımlanmıştır. Bazı araştırmacılar siklin D1 ekspresyonu ile tümör rekürrensi ve progresyonu arasında ilişki tanımlamıştır. Ancak bu veriler daha tam olarak doğrulanmamıştır (6).

*MDM2 geni amplifikasyonu* mesane kanserli olguların %4-6'sında görülmektedir (6).

#### *Tümör süpresör genler*

*TP53 geni* 17q23 enkodunda lokalize DNA tamir genidir. TP53 geni mutasyonları insan tümörlerinde sık görülen bir durumdur. Bir kaç çalışmada (en az 30 tümörle yapılmış) invaziv mesane tümörlerinin %40-60'ında TP53 gen mutasyonu görülmüştür (6).

*PTEN geni* 10q23.3'de lokalize bir tümör süpresör gendir. Kas invaziv mesane kanserlerinde heterozigosite kaybı %20-30 oranında ilişkili bulunmuştur (6).

*Retinoblastom geni (RB)*, 13q14 enkodunda lokalize bir tümör süpresör gendir. RB inaktivasyonu değişik kanserlerde karsinogenez ve progresyonun önemli bir basamağı olduğu bilinmektedir. Kas invaziv mesane tümörlerinde RB inaktivasyonu %30-80'dir.

## MESANE TÜMÖRLERİNİN HİSTOLOJİK SINIFLANDIRILMASI

Mesane tümörlerinde günümüzde en çok Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslar arası Üropatoloji Uzmanları Birliği'nin (ISUP) ortak sınıflama sistemi WHO/ISUP 2004 sıklıkla kullanılmaktadır (Tablo 1).

**Tablo 1:** Mesane Tümörlerinin Histolojik Sınıflandırılması WHO 2004

### Ürotelyal Tümörler

İnvaziv ürotelyal karsinom

Skvamöz diferansiyasyonlu

Glandüler diferansiyasyonlu

Trofoblastik diferansiyasyonlu

Nested varyant

Mikrokistik varyant

Mikropapiller varyant

Lenfoepitelyoma benzeri varyant

Plazmositoid varyant

Sarkomatoid varyant

Dev hücreli varyant

İndiferansiye

Non-invaziv ürotelyal karsinom

Ürotelyal karsinoma in-situ

Non-invaziv papiller ürotelyal karsinom, yüksek grade

Non-invaziv papiller ürotelyal karsinom, düşük grade

Non-invaziv papiller ürotelyal neoplazi, düşük malignite potansiyelli

Ürotelyal papillom

Inverted ürotelyal papillom

### Skvamöz Neoplaziler

Skvamöz hücreli karsinom

Verrüköz karsinom

Skvamöz hücreli papillom

**Glandüler Neoplaziler**

Adenokarsinom

Enterik

Taşlı yüzük hücreli

Müsinöz tümörler

Berrak hücreli

Villöz adenom

**Nöroendokrin tümörler**

Küçük hücreli karsinom

Karsinoid

Paragangliom

**Melanositik Tümörler**

Malign melanom

Nevus

**Mezenkimal Tümörler**

Rabdomyosarkom

Leiomyosarkom

Anjiosarkom

Osteosarkom

Malign fibröz histiositom

Leiomyom

Hemanjiom

Diğerleri

**Hematopoetik tümörler**

Lenfoma

Plazmositom

**Diğerleri**Skenenin karsinomu, Cowper  
ve Littre bezleri

Metastatik

**DERECELENDİRME**

ÜK'lere ait bilinen ilk derecelendirme sistemi, 1922 yılında yayınlanan Broders derecelendirme sistemidir (10). O tarihten bu yana pekçok derecelendirme sistemi önerilmiştir (Tablo 2). Günümüzde en çok Modifiye Bergkvist ve WHO/ISUP 2004 derecelendirme sistemleri kullanılmaktadır.

**Tablo 2: Derecelendirme Sistemlerinin Tarihiçesi**

1922	Broders
1940	Ash (11) Derece I, II, III, IV
1950	Franksson (12)
1965	Bergkvist ve ark.(13) Derece 0 ( <i>Papillom</i> ), I, II, III, IV
1973	WHO 1973 (14)- <i>Papillom</i> , Derece I, II, III
1975	Koss (15)- <i>Papillom</i> , Derece I, II, III
1987	Modifiye Bergkvist (16) Derece 0 ( <i>Papillom</i> ), I, IIA, IIB, III, IV
1994	Murphy (17) <i>Papillom</i> , Düşük Dereceli Karsinom, Yüksek Dereceli Karsinom
1998	The World Health Organization/International Society of Urological Pathology (WHO/ISUP) 1998 (18) <i>Papillom</i> , Düşük Malignite Potansiyelli Papiller Ürotelyal Neoplazm (DMPPÜN), Düşük Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom, Yüksek Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom
1999	WHO 1999 (19) <i>Papillom</i> , DMPPÜN, Derece I, Derece II, Derece III
2004	WHO 2004 (6)-İnfiltratif Ürotelyal Karsinom, Non-invaziv Ürotelyal Neoplaziler (Ürotelyal Karsinoma İn situ, Non-invaziv Papiller Ürotelyal Karsinom, (yüksek dereceli), Non-İnvaziv Papiller Ürotelyal Karsinom, (düşük dereceli), Düşük Malignite Potansiyelli Non-invaziv Papiller Ürotelyal Neoplazm, Ürotelyal Papillom, İverted Ürotelyal Papillom)

**Modifiye Bergkvist:**

Bergkvist derecelendirme sistemi ilk kez 1965 yılında Bergkvist ve ark. tarafından öne sürülmüş; 1987 yılında da Malmström ve ark. tarafından yeniden düzenlenmiştir (20).



Bu sistem, benign ve malign değişici epitel tümörleri için *Transizyonel Hücreli Tümör* terimini kullanır ve onları sitolojik özelliklerine göre 0'dan IV'e kadar derecelendirir (II. derece A ve B olmak üzere iki alt gruba ayrılır) (4,21). Derece 0 tümörler papillomları, derece I-IV tümörler ise karsinomları temsil ederler.

Derece I: Nükleus sitoplazma oranı korunmuş; nükleer büyüklük farkı çok hafif, nükleuslar yuvarlak ya da oval, nükleer membran ince ve düz; mitoz çok nadir.

Derece IIA: Nükleer büyüklük farkı hafif/orta (aynı düzeydeki komşu hücrelerin her bir çapı arasında 2 kattan az büyüklük farkı var), nükleer membran belirgin ancak düz, kromatin paterni çok ince; mitoz az sayıda.

Derece IIB: Nükleus sitoplazma oranı artmış; nükleer büyüklük farkı orta/belirgin (aynı düzeydeki komşu hücrelerin her bir çapı arasında en az 2 kat büyüklük farkı var), nükleer membran belirgin, kromatin paterni hiperkromatik; mitozlar kolaylıkla bulunur.

Derece III: Nükleus sitoplazma oranı artmış ya da değişken; nükleer büyüklük farkı çok belirgin (aynı düzeydeki komşu hücrelerin her bir çapı arasında en az 3 kat büyüklük farkı var), nükleer membran düzensiz, kromatin paterni kaba ve nükleolus belirgin ancak ürotelyal köken hala tanınabilir;

Derece IV: Nükleer büyüklük farkının aşırı olduğu anaplastik ya da sarkomatöz tümörler. Anaplastik alanlarda ürotelyal köken tanınamaz; mitoz çok sayıda ve bazıları atipik (21).

#### **WHO/ISUP 2004:**

#### **Non-İnvaziv Ürotelyal Neoplaziler**

**Ürotelyal Papillom:** Mesane tümörlerinin %1-4'ünü oluşturur. Küçük boyutlu ve soliter lezyonlar olup, daha çok genç ve çocuk hastalarda görülür. Erkek/kadın oranı 1.9/1'dir. Makroskopik ya da mikroskopik hematüri başlıca semptomdur. Histolojik olarak fazla dallanma veya birbiri ile kaynaşma

göstermeyen eksofitik papiller yapılar izlenir. Ürotelyum normal kalınlıktadır. Yüzeyel hücreler dışında sitolojik atipi izlenmez. Mitoz yoktur ya da nadiren bazal tabakada sınırlı olarak seçilebilir. Ki-67 proliferasyon indeksi düşüktür ve sitokeratin-20 (CK 20) ile yalnızca yüzeyel şemsiye hücrelerinde pozitif boyanma gözlenir. Üroteliyal papillomlar nadiren rekürrens gösterirler (6,22).

***Inverted Papillom:*** Üroteliyal lezyonların %1'inden azını oluşturur. Erkek/kadın oranı 4-5/1'dir. 10-94 yaş aralığında herhangi bir yaşta görülebilir. Sıklıkla 6. ve 7. dekatlarda pik yapar. Etyolojisi kesin olarak bilinmiyor ama von Brunn yuvalarının hiperplazisi ve kronik üroteliyal inflamasyonun neden olabileceği düşünülmüştür. %70'den fazla olguda mesane yerleşimidir. Trigon en sık lokalizasyondur. Hematüri en sık görülen semptomdur. Makroskopik olarak düzgün yüzeyli pedünküle ya da sesil polipoid lezyonlardır. Sıklıkla 3 cm'den küçüktür ama nadiren 8 cm'den de büyük olabilir. Histopatolojik olarak inverted büyüme paterni gösteren, normal ya da minimal sitolojik atipi gösteren hücreler ile dōşeli benign ürotelyal bir tümördür. Trabeküler ve glandüler subtipleri tanımlanmıştır. Non-keratinize skuamöz metaplazi odakları sıklıkla görülebilir. Mitotik figürler nadirdir ya da yoktur. Bu lezyonların %1'inden azında rekürrens görülmüştür (6).

***Düşük Malignite Potansiyelli Papiller Üroteliyal Neoplazi (DMPPÜN):*** İnsidansı 3/100.000 olup erkek/kadın oranı 5/1'dir. Üreteral orifislerin yakınında lateral ve posterior duvarda görülür. Sıklıkla makroskopik ve mikroskopik hematüri görülür. Histopatolojik olarak minimal yapısal anormallikler ve minimal nükleer atipi içeren papiller yapılarla karakterlidir. Epitelin daha kalın ve/veya nükleusların daha geniş olduğu ve papillomlarla ayırt edilmelerinde bu yapısal ve sitolojik atipiyeye dikkat edilmesi gerektiği vurgulanmaktadır. Mitozlar az sayıda ve genellikle bazal tabakaya sınırlıdır. Nadir olgular dışında invazyon ve metastazla ilişkili olmamakla birlikte nüks ve yeni papiller lezyon gelişim riski artmıştır. Yeni lezyonlar daha yüksek dereceli olma ve progresyon gösterme eğilimindedirler (6).

***Karsinoma İn-Situ (CİS):*** Primer karsinoma in-situ ürotelyal neoplazilerin %1-3'ünden azını oluşturur. İnvaziv ÜK eşliğinde %45-65 oranında görülür. Sıklıkla yaşamın 5. ve 6. dekatlarında görülür. Asemptomatik olabileceği gibi, semptomatik de olabilir. Makroskopik olarak mukoza ödemli ve erozyone olabilir. Histopatolojik olarak, ürotelyumda dökülme izlenmekle birlikte kural değildir. Yüksek dereceli tümörlerde olduğu gibi, çekirdeklerde belirgin irileşme, pleomorfizm ve hiperkromazi vardır. Mitoz sıktır ve epitelin üst tabakalarına kadar uzananabilen atipik karakterde olabilir. Epitelyal bulgulara ek olarak lamina propriada vaskülarite artışı, ödem ve inflamasyon izlenebilir. Literatürde farklı karsinoma in-situ tipleri tanımlanmıştır (6,23, 26). Histolojik incelemede daha kolay tanınabilen tip *pleomorfik büyük hücreli* tiptir. Ayrıca *küçük hücreli monoton tip* ve ürotelyal dökülmenin ön planda olduğu "*clinging*" tip diğer başlıca karsinoma in-situ tipleridir. Primer karsinoma in-situ olgularında prognoz daha iyidir. Sekonder olgularda özellikle invaziv tümör varlığında mortalite oranı artar (6,22). Karsinoma in situda sitokeratin-20 anormal olarak eksprese edilir. Anormal P53 ve RB protein ekspresyonları prognozla korele olabilir (6).

***Non-İnvaziv Papiller Ürotelyal Karsinom, Düşük Dereceli (DDPÜK):***

İnsidansı, her yıl 5/100.000'dir. Erkek/kadın oranı 2.9/1'dir. Ortalam görülme yaşı 69.2'dir. Olguların %70'inde üreteral orifislerin yakınında lateral ve posterior duvarda görülür. Klinik olarak makroskopik ve mikroskopik hematüri görülür. Olguların %78'inde tek bir tümör odağı, %22'sinde ise iki ya da daha fazla tümör odağı görülür. Histopatolojik olarak küçük büyütmelerde bile kolaylıkla tanınabilen yapısal ve/veya sitolojik varyasyonlar (polarite; nükleer büyüklük, biçim ve kromatin yapısındaki varyasyonlar) içeren papiller yapılardan oluşur. Mitozlar az sayıda ve genellikle alt yarıya sınırlıdır ancak herhangi bir düzeyde olabilirler.

Lezyonlar lamina propriayı (LP) invaze edebilirler. Çoğunda nüks görülmekle birlikte hastalık progresyon ve mortalite oranı yüksek dereceli tümörlerden belirgin derecede azdır (6,22).

### ***Non-İnvaziv Papiller Üroteliyal Karsinom, Yüksek Dereceli (YDPÜK):***

Bu tümörler küçük büyütmeye bütünüyle ya da baskın olarak düzensiz görünüm ile karakterlidirler. Düzensiz görünüm hem yapısal hem de sitolojik anormalliklerden kaynaklanır. Yapısal olarak hücreler düzensiz kümelenmiş ve epitel disorganizedir. Sitolojik olarak orta/belirgin derecede pleomorfizm izlenir. Nükleer kromatin kabalaşmış ve nükleol belirginleşmiştir. Atipik formları da içeren mitozlar tüm tabakalar da kolayca saptanabilirler.

Olguların %15-40'ı progresyon riski taşır. Lezyon içindeki sitolojik atipi ile paralel olarak komşu mukozada CİS izlenebilir (6, 22).

### **İnfiltratif Üroteliyal Karsinomlar**

İnfiltratif karsinomlar makroskopik olarak, papiller, polipoid, noduler, solid, ülseratif ve transmural diffüz büyüme paternleri gösterir. Soliter ya da multifokal olabilirler. Tümöre komşu çevre mukoza normal ya da eritemli görülebilir. pT1 tümörlerin çoğu papillerdir ve düşük ya da yüksek dereceli olabilir. pT2-T4 tümörler sıklıkla non-papiller ve yüksek derecelidir (6).

ÜK'lerde patolojik değerlendirmede en önemli durum invazyonun varlığı ve uzanımıdır. İnvazyon, LP'nin invazyonu ve MP'nin invazyonu olmak üzere iki aşamada değerlendirilir. Birincisini saptamak güç ve görece daha subjektif olmakla birlikte ikincisini saptamak evreyi ve dolayısıyla sağaltımı bütünüyle değiştirdiği için önemlidir (4). Erken invaziv ÜK'lerde (pT1) invazyon alanları, papiller kor ya da lamina propriada yuvalar, kümeler, tek hücreler ile karakterlidir (6). Lamina propria invazyonunu değerlendirmede bir takım morfolojik kriterler kullanılmaktadır. Bunlar, desmoplastik stromal yanıt, tümör hücreleri çevresinde retraksiyon artefaktının varlığı ve paradoksal diferansiyasyondur. Tanjansiyel kesit, termal ya da mekanik hasar, neoplastik hücreleri maskeliyecek kadar çok yangısal hücre infiltrasyonunun eşlik etmesi ve lezyonun inverted büyümesi invazyonu değerlendirmede güçlük yaratır (4,6). Lenfovasküler invazyonun retraksiyon artefaktından ayırt edilmesi ise çoğu zaman immunhistokimyasal incelemelerle mümkün olur (3,4,6).

İnfiltratif ÜK'ler geniş eozinofilik, amfofilik sitoplazmalı ve geniş hiperkromatik nükleuslu hücrelerden oluşan koheziv yuvalar ile infiltrasyon gösterir. Büyük yuvaların kenarında, nükleusun palizadlanması görülebilir. Nükleus tipik olarak pleomorfik, düzensiz ve köşeli kontürlere sahiptir. Nükleolus, tek ya da multipl ve küçük yada iri eozinofilik görünümde olabilir. Bizaar ve multinükleer tümör hücrelerinden oluşan belirgin pleomorfizm odakları görülebilir. Mitotik figürler sıktır ve bir kısmı atipik formdadır. İnvaziv yuvalar sıklıkla desmoplastik stromal yanıtı artırır. Nadiren stroma malign işi hücrelere benzeyebilir ve bu durumda pseudosarkomatöz stromal reaksiyon olarak adlandırılır. Stromada çoğunlukla, az sayıda plazma hücrelerini de içeren lenfositik infiltrasyon görülür. Nötrofiller ve eozinofiller nadiren bulunur. Skuamöz ve glandüler diferansiyasyon odakları sıktır ve bulunduğu rapor edilmelidir. Komşu ürotelyumda karsinoma in-situ odakları bulunabilir. Nadiren mukoid sitoplazmik inklüzyonlar görülebilir (6).

Bu tümörlerin çeşitli sitolojik ya da yapısal varyasyonları söz konusudur. *Skuamöz diferansiyasyon*, keratinizasyon ve intersellüler köprülerin varlığı ile karakterizedir ve mesane ÜK'lerinin %21'inde görülür. Sıklıkla yüksek dereceli tümörlere eşlik ettiği için bazı hastalarda kötü prognoz görülmüştür (6). ÜK'lerin yaklaşık %6'sında müsin içeren intrasitoplazmik vakuollerle karakterli *glandüler diferansiyasyon* tanımlanmıştır (4-6). ÜK'lerin %14-63'ünde fokal müsin üretimi bulunabilir, bu durum glandüler diferansiyasyon ile karıştırılmamalıdır (6). *Nested varyant* ÜK, agresif bir varyant olup lamina propria içine infiltratör Brunn adaları görünümündedir. Sitolojik atipi az ya da yoktur (6). Nadiren *mikrokistik varyant* ÜK gelişebilir. Kistler, oval ya da yuvarlak, bazen elonge şekillidir. Nekrotik ya da soluk pembe bir sekret içerebilir. Kistleri döşeyen bir epitel olmayabilir (4,6). Daha nadir olarak da baskın olarak işi hücrelerin oluşturduğu, yer yer de sıradan görünümlü küçük ÜK adaları içeren ve heterolog elemanlarda görülebilen *sarkomatoid* (6); overin seröz papiller tümörlerini taklit eden *mikropapiller* (4,6); nazofarinksin lenfoepitelyomasını taklit eden *lenfoepitelyoma benzeri varyant* (6); myelomla karışabilen *plazmasitoid* (4,6) ve son derece nadir , *lipid*

*hücreli, dev hücreli, trofoblastik diferansiyasyonlu, berrak hücreli varyantlar da bildirilmiştir (6).*

### **İmmünohistokimya ve Diğer Özel Teknikler**

ÜK'ler sitokeratin 7 ve sitokeratin 20 güçlü pozitiflik gösterir. ÜK'lerin özellikle yüksek dereceli olanları sitokeratin 8/18; CEA, katepsin B, CA19-9, Leu-M1, survivin, androjen reseptörleri ve hatta HCG ile pozitif immünreaksiyon verirler (4,6). Çoğu ÜK p63 ile güçlü nükleer, yüksek molekül ağırlıklı sitokeratin ile sitoplazmik immunreaktivite verir (23). Sarkomatoid tümörlerdeki işsi hücrelerin vimentinle de boyandıkları bildirilmiştir (6).

ABO kan grup antijenlerinde delesyon özellikle de yüksek dereceli ÜK'lerin sık bir bulgusudur. İlişkili başka bir anormallik, normal ürotelyumda bulunmayan Lewis X antijeninin ekspresyonudur (4).

Elektron mikroskopik incelemede tüm ÜK'lerde pleomorfik mikrovilluslar olduğu ve yüksek dereceli tümörlerde özelleşmiş junctionların azaldığı görülür (4).

### **EVRELENDİRME**

ÜK için pek çok evreleme sistemi olmakla birlikte en sık kullanılanı, American Joint Cancer Committee (AJCC) ve International Union Against Cancer (UICC) tarafından da önerilen Tümör-Nod-Metastaz (TNM) sistemidir (6,24), (Tablo 3).

### Primer Tümör (T)

Tx Primer tümör saptanamadı.

T0 Primer tümör kanıtı yok.

Ta Noninvaziv, papiller karsinom

Tis Noninvaziv, flat (karsinoma in situ, CIS)

T1 Tümör lamina propriayı invaze etmiş

T2 Tümör muskularis propriayı invaze etmiş

T2a: Tümör muskularis proprianın iç ½' sini invaze etmiş

T2b: Tümör muskularis proprianın dış ½' sini invaze etmiş

T3: Tümör perivezikal yağ dokusunu invaze etmiş

T3a: Mikroskopik invazyon

T3b: Makroskopik invazyon

T4: Tümör komşu organ/dokuları invaze etmiş (prostatik stroma, seminal vezikül, uterus, vajina, pelvik duvar ve abdominal duvar)

T4a: Tümör prostat (stroma), uterus veya vajinayı invaze etmiş

T4b: Tümör pelvis duvarını veya abdominal duvarı invaze etmiş

### Bölgesel Lenf Nodları (N)

Not: Gerçek pelvis içindeki lenf nodları bu gruba girer, diğer lenf nodları uzak metastaz sayılır.

NX: Bölgesel lenf nodu değerlendirilemedi.

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok.

N1: Gerçek pelviste (hipogastrik, obturator, eksternal iliak, ya da presakral lenf nodu)tek bir lenf nodu metastazı

N2: Gerçek pelviste multipl lenf nodu metastazı

N3: Common iliak lenf nodu metastazı

### Uzak Metastaz (M)

MX: Uzak metastaz varlığı değerlendirilemedi

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var

ÜK'ler en sık olarak bölgesel lenf nodlarına, akciğerlere, karaciğere, iskelet sistemine ve santral sinir sistemine metastaz yaparlar (4,6).

**Tablo 3:** AJCC/2010' a göre Evrelendirme

<b>EVRE</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
0a	Ta	N0	M0
0ais	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2a	N0	M0
	T2b	N0	M0
III	T3a	N0	M0
	T3b	N0	M0
IV	T4a	N0	M0
	T4b	N0	M0
	Herhangi bir T	N1-3	M0
	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

## **SAĞALTIM**

ÜK'lerin sağaltımı hastanın yaşı, taşıdığı cerrahi riskler; tümörün derecesi, evresi, tümörün boyutu, nüks varlığı ve mesane içinde herhangi bir yerde CİS ya da displazi veya tümör olup olmadığı göz önüne alınarak planlanmalıdır (4).

Avrupa ve Amerika Üroloji Dernekleri yüzeysel mesane ÜK'lerini (Ta, Tis, T1) yukarıda tanımlanan risk faktörlerine göre "düşük risk grubu", "orta risk grubu" ve "yüksek risk grubu" olarak ayırmaktadır. Buna göre düşük risk grubundaki hastalara tek doz intravezikal kemoterapi, orta risk grubundaki hastalara TUR sonrası intravezikal kemoterapi veya intravezikal BCG, yüksek risk grubundaki hastalara intravezikal BCG tedavisi uygulanmaktadır. Yüksek risk grubunda yer alan T1- yüksek derece tümörlere, mesane koruyucu tedaviler yanı sıra radikal sistektomiye kadar giden geniş tedavi



yelpazesi uygulanmaktadır. Kas invaziv olgularda (T2), perivezikal yayılımında (T3), tedaviye dirençli yüksek riskli yüzeysel tümörlü hastalarda (Ta, T1-yüksek derece), tedaviye dirençli karsinoma in situ, standart tedaviler ile kontrol altına alınamayan düşük ve orta risk grubundaki yüzeysel mesane tümörlerinde radikal sistektomi altın standarttır. Metastatik yayılım bulgusu bulunan hastalara (lenf nodu, akciğer, karaciğer), T4a ve T4b hastalara kemoterapi ve radyoterapi uygulanmaktadır (25).

## **PROGNOZ**

### *Klinik faktörler*

ÜK'lerde en önemli prognostik faktörler mesane duvarına invazyonun derinliği ve tümörün diferansiyasyon derecesidir (3-4). Beş yıllık yaşam oranı Ta tümörlü olgular için %90, T1 tümörlü olgular için %75, T2 tümörlü olgular için %63, T3 tümörlü olgular için %53, T4 tümörlü olgular için %21 olarak bildirilmiştir (3,32). Diferansiyasyon derecesi ise evre ile bağlantılı olmakla birlikte aynı evre içinde bağımsız bir prognostik faktördür (4).

Hastanın yaşı, önceki ürotelyal tümör öyküsü, tümörün lokalizasyonu, büyüklüğü, konfigürasyonu, multifokalitesi, vasküler invazyon, ilişkili CIS varlığı ve lenf nodu tutulumu da prognozu etkileyen faktörlerdendir (3-4,6) Yaşamın ilk iki onyılında ortaya çıkan ÜK'ler genellikle noninvaziv ve iyi diferansiye tümörlerdir (4). Mesane boynu lokalizasyonlu tümörlerin de daha kötü prognozlu oldukları rapor edilmiştir (3). Papiller tümörler daha düşük evreli, dereceli ve daha az agresif olma eğilimindedirler (3). Kakizoe ve ark. 186 sistektomi materyali ile yaptıkları bir çalışmada solid tümörlerin daha yüksek dereceli olduğunu ve bu grupta yaşam süresinin daha kısa olduğunu rapor etmişlerdir ( $p<0,01$ ) (26). İster kan damarı isterse lenfatik invazyonu şeklinde olsun vasküler invazyon ile ana tümör kitlesinden bağımsız küçük tümör ya da displazi odaklarının varlığı artmış nüks oranı ile ilişkilidir (4). Lenf nodu tutulumu evreyi değiştirdiği için kötü prognoz işareti olarak kabul edilmektedir. Bu tür hastaların uzun süreli yaşam beklentisi sifıra yakındır (4).

### *Genetik faktörler*

Son dönemlerde p53 ve Rb ekspresyonu, DNA ploidi ve hücre proliferasyonu üzerinde de durulmaktadır (3,4). Artmış p53 ekspresyonunun pT1 tümörlerde progresyon ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (4). Azalmış Rb ekspresyonu agresif davranışla ilişkili olmakla birlikte bağımsız bir prognostik faktör olup olmadığı net değildir (6). DNA ploidi ile mikroskopik derece ve klinik gidiş arasında yüksek korelasyon gözlenmiştir (4). Proliferasyon belirleyicileri ile ilgili olarak bazı serilerde yüksek mitoz sayısının ya da yüksek S faz fraksiyonunun bağımsız bir prognostik faktör olduğu savunulmaktadır (4). Stein ve ark. yaptığı, radikal sistektomi ile tedavi edilen 242 invaziv mesane kanserli bir seride, p21, tümör nüksünü ve yaşam süresini bağımsız olarak öngörebilmektedir (6). ÜK'lerde tümörün derecesi, evresi ve ölüm oranı arttıkça p27 ekspresyonu azalmaktadır (9). Yüzeysel mesane tümörlerinde, p27 ekspresyonunun azalması erken nüksün bir göstergesidir (9). Ki-67 ekspresyonunun nüks ve progresyonu belirlemede tek başına önemli olduğu bildirilmiştir (9,27,28). Mesane kanseri olgularında, HER2/neu ekspresyon düzeyinin yükseldiği ve ekspresyon ile ileri tümör evresi, tümör progresyonu, metastatik hastalık gelişimi ve yaşam süresinde azalma arasında ilişki olduğu bilinmektedir (6,9). COX-2 ekspresyonu radikal sistektomi ile tedavi edilmiş 172 hastalı bir seride iyi prognoz ile ilişkili bulunmuştur (6). EGFR overekspresyonu invaziv mesane kanserlerinin %30-50'sinde saptanmıştır (6). EGFR'nin ekspresyonu, artmış tümör nüksü ve progresyonuyla ve azalmış sağkalım ile ilişkilidir (6). Mesane tümörlerinde mikrodamar yoğunluğunun artması yüksek nüks ve düşük yaşam süresi ile ilişkili bulunmuştur. İnvaziv mesane tümörlerinde tümör angiogenezi tümör progresyonu ve genel yaşam süresini ön görebilen bağımsız belirleyicilerdir (6,29,30,31).

## LENFANJİOGENEZİS

Lenfatik damarların major fonksiyonu, proteinden zengin interstisyel sıvının, lenf nodları, büyük toplayıcı lenfatik damarlar ve torasik duktus yoluyla transportunu ve kan damar sirkülasyonuna geri dönüşümünü sağlamaktır (33,34).

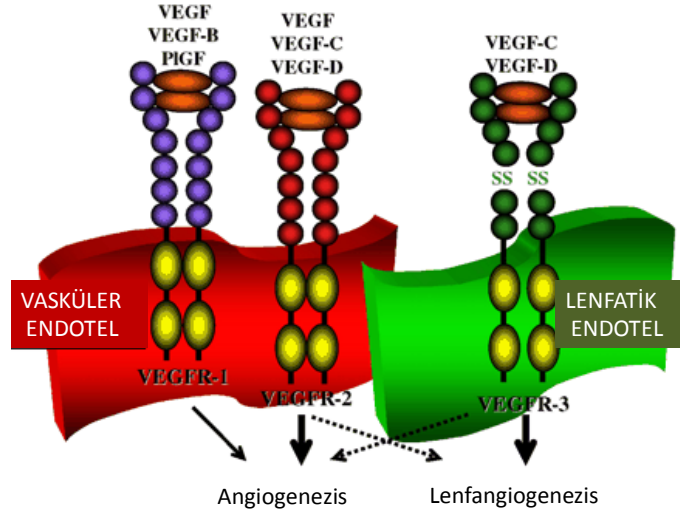
Lenfatik kapillerler tek sıralı endotel hücreleri ile döşelidir. Lenfatik endotel hücrelerinde fenestrasyonlar bulunmaz. Kan kapiller damarlarının aksine lenfatik kapillerlerinde sürekli bir bazal membran ve perisitler yoktur. Tıpkı kan damarı endoteli gibi Weibel-Palade cisimciklerini içerir ve bunlar von Willebrand faktör ve CD31 ile immunreaktifler (35).

Vaskülogenezis ve embriyonik lenfanjiogenezisin gelişim mekanizmaları hakkında iki teori ortaya atılmıştır. a-) lenfatik endotelin lenfanjioblastlardan, kan damarı endotelinin ise angioblastlardan de nova olarak şekillenmesi, b-) önceden var olan kan kapillerlerinden angiogenezisin, venlerden de lenfanjiogenezisin filizlenmesidir (36, 37). Sabin primitif lenf kesesinin origininin embriyonik venlerden tomurcuklanan endotelial hücrelerden olduğunu ortaya atmıştır. Şimdi, bir yüzyıl sonra genetik çalışmalar, lenfatikleri indükleyen sinyallere cevap veren bazı venöz endotelial hücrelerin lenfatik kökenine dönüştüğü ve son olarak da lenfatiklere tomurcuklandığını desteklemektedir. Prox-1 bir homeobox transkripsiyon faktörüdür ve trans-diferansiyasyonun başlangıcında ve tomurcuklanmada kritik bir rol oynar. Scheneider ve ark.'nın kuşlar üzerinde yaptığı bir çalışma da lenfatik damarların primitif lenfanjioblastlardan köken aldığını kuvvetlendirmektedir. Sonuçta her iki mekanizma da lenfatik sistemin gelişimi için katkıda bulunmaktadır (38).

VEGFR-3, ilk lenfatik spesifik, büyüme faktörü reseptörü olarak tanımlanmıştır. Normal erişkin dokularında VEGFR-3 ekspresyonu çoğunlukla lenfatik endotelde sınırlıdır (39). Ancak tümörlerde kan damarlarından da eksprese edilebilmektedir (40). VEGFR-3 tirozin kinaz ailesinden olup, lenfanjiogenik faktörler olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)-C ve D için lenfatik endotelinde reseptördür (Şekil 1) (41, 42).

Son zamanlarda tanımlanan lenfatik damarlara özgü endotelial markerlar, LYVE, podoplanin, prox-1, VEGFR-3, M2A, desmoplakin, D6, mannoz reseptör, 5'-nükleotidaz ve D2-40'dır (40,43-44).

**Şekil-1:** Büyüme faktörleri ve lenfangiogenesis



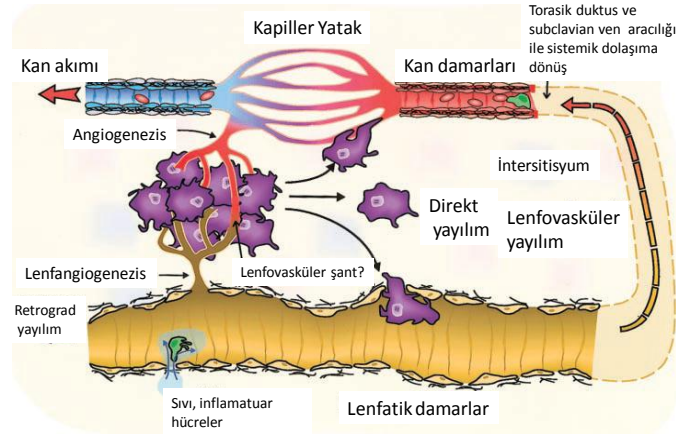
## TÜMÖR VE LENFANJİOGENEZİS

Günümüze kadar, bölgesel lenf nodlarına tümör yayılımının sadece afferent lenfatik kanallardan ve doğal lenfatik drenaj yolu ile olduğuna inanılırdı. Son çalışmalarda de nova intratümöral lenfatik kapillerlerin oluşumu ile birlikte primer tümör hücrelerinin yeni kan damarlarının şekillenmesine (anjiogenesis) veya yeni lenfatik damarların şekillenmesine (lenfanjiogenesis) neden olabildiği saptanmıştır. Böylece tümör hücrelerinin lenfatik yayılımda direkt rol oynadığı gösterilmiştir. Bunu, tümör ilişkili anjiogenik ve/veya lenfanjiogenik faktörler (vasküler endotelial büyüme faktörleri; VEGF-C ve VEGF-D) yoluyla sağlarlar (şekil-2) (40).

Lenfanjiogenesisin malign tümörlerin lenf nodu metastazını ve progresyonunu sağladığı düşünülmektedir. Son çalışmalarda, baş boyun skuamöz hücreli karsinomları, kutanöz melanomlar, üst üriner trakt

transizyonel hücreli karsinomları, serviks, pankreas, akciğer, kolorektal karsinomlarında, gastrik karsinomlarda lenfanjiogenezis, lenfatiklere özgü antikolarla saptanmıştır ve regional lenf nodu metastazı ve kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (45-52). Ancak meme ve prostat karsinomlarında yapılan bazı çalışmalarda çelişkili bulgular görülmektedir (53, 54).

**Şekil-2:** Tümör hücresinin lenfanjiogenezis ve anjiogenezis yoluyla yayılımı



## D2-40

Podoplaninin fiksasyon-rezistans epitopu olan D2-40, insan podoplanini olarak da tanımlanır (44,55). D2-40 bir fetal gonadal antijen olan 40000 kDa ağırlığında, O-linked sialoglikoprotein olan M2A antijenine bağlanan yeni bir monoklonal antikordur (56). D2-40'ın lenfatik endotelinin spesifik bir belirleyicisi olduğu normal ve neoplastik dokularda gösterilmiştir (56-58,60, 61,44). D2-40 rutin olarak lenfanjiogenezisin immunohistokimyasal çalışmalarında kullanılabilir (34).

M2A antijeni germ hücreli tümörlerde tanımlanmıştır ama yetişkin gonadal dokuda gösterilmemiştir (56, 58). Ayrıca M2A antijeninin overin germ hücreli tümörlerinde eksprese edildiği ancak, diğer non-germ hücreli tümörlerde eksprese edilmediği gösterilmiştir (63). D2-40'ı normal lenfatikler

dışında, erişkin non-neoplastik santral sinir sistemindeki bir takım hücrelerin de eksprese ettiği saptanmıştır. Coroid pleksus epitelinde, endepimal hücrelerde, subependimal alanlarda ve leptomeninkslerde güçlü pozitiflik göstermiştir. Serebellar korteksin ise purkinje hücrelerinde ve dendritik süreçlerde membranöz bir boyanma göstermiştir (64). Bir çalışmada D2-40'ın lenfoid folliküler dendritik hücrelerde de pozitif olduğu bulunmuştur (65). Huse ve arkadaşlarının (66) yaptığı çalışmada D2-40'ın düşük dereceli kondrosarkomlarda pozitif boyandığı, kordomalarda ise boyanma göstermediği saptanmış olup, D2-40'ın bu iki tümör ayırımında faydalı olan ilk immünohistokimyasal belirteç olduğu bildirilmiştir. Takei ve arkadaşlarının (67) yaptığı çalışmada ise, bir santral sinir sistemi tümörü olan kapiller hemanjiyoblastom ile bazı tümörlerin ayırıcı tanısı yapılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada beyin metastazı yapmış renal hücreli karsinom ile karşılaştırıldığında D2-40'ın kapiller hemanjiyoblastom lehine boyanma gösterdiği saptanmıştır. Uterin serviksle ait yapılan çalışmalarda da Hematoksilin-eozin kesitlerinde görülemeyen tümör hücrelerinin lenfatik invazyonları D2-40 ile gösterilmiştir. Bu sayede servikal biyopsilere uygulanacak D2-40 boyamasının rekürrens riskini azaltmada önemi vurgulanmıştır (68,69).

D2-40 mezotelyal hücrelerde belirleyici olarak kullanılmıştır ve mezotelyoma ile adenokarsinom arasında güçlü bir ayırım sağlayabilmektedir (70). 62 vasküler lezyonun alındığı bir çalışmada ise, 24 kutanöz kaposi sarkomunun 24'ünde, 7 anjiyosarkomun 3'ünde pozitif boyanma göstermiştir (44). D2-40 pozitif bir retiform hemanjiyendozelyoma olgusu bildirilmiştir (71).

Kutanöz melanomlar, baş boyun skuamöz hücreli karsinomları, alt üriner trakt transisyonel hücreli tümörlerde, tiroid, kolorektal, böbrek, meme, pankreas, gastrik karsinomlarda D2-40 ile gösterilen, intratümöral lenfanjiogenezisin tümör progresyonu ve kötü prognozla ilişkili olduğu saptanmıştır (72-79).

Gastrik karsinomlar, akciğer, baş boyun skuamöz hücreli karsinomları, serviks, prostat, böbrek ve kolorektal karsinomlarda peritümöral lenfatik

damar yoğunluğunun (LDY) regional lenf nodu metastazı ve kötü prognozla ilişkili olduğu bulunmuştur (74, 80-83).

Kas invaziv mesane ÜK'lerinde yapılan bir çalışmada LDY peritümöral bölgede, intratümöral ve normal mukoza alanlarına göre belirgin fazla bulunmuştur. Bu çalışmada yüksek intratümöral LDY kötü histolojik diferansiyasyon ile ilişkili iken peritümöral LDY ise lenf nodu metastazı ile ilişkili bulunmuştur (85). Başka bir çalışmada ise artmış LDY, lenfatik invazyon, lenf nodu metastazı ile ilişkili bulunmuştur (86). Ayrıca deneysel ve klinik başka çalışmalarda da mesane tümörlerinde LDY'nin prognostik bir faktör olduğu vurgulanmıştır (87,88).

## **VEGF AİLESİ**

Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri süper ailesinin üyesi olan VEGF ailesi, endotel hücreleri için özgüdür ve önemli etkileri vardır. VEGF, başlangıçta damar geçirgenliğini artıran bir faktör olarak tanımlanmıştır. Daha sonraları endotel hücrelerinin çok sayıdaki biyolojik fonksiyonunu düzenlediği ortaya konmuştur (89). Bu fonksiyonlar arasında sitokin sentezi ve salınımı, trombolitik ve pıhtılaşma yollarında yer alan moleküllerin ekspresyonu ve düz kas hücre hiperplazisi yer almaktadır. Bu yüzden 1980'lerde keşfedildiğinden günümüze kadar gittikçe artan bir ilgiyle araştırılmaktadır (90). Bugüne kadar VEGF ailesinin 7 üyesi saptanmıştır. Bunlar VEGF-A ( human VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F ve PlGF'dür. Tablo-4'de VEGF üyeleri, reseptörleri ve fonksiyonları özetlenmiştir (91).

**Tablo-4:** VEGF Ailesi ve Fonksiyonları

Ligand	Reseptör	Fonksiyon
VEGF (VEGF-A)	VEGFR-1 ve 2 Nöropilin-1	Anjiogenez, Vasküler Bilinmiyor
VEGF-B	VEGFR-1	Bilinmiyor
VEGF-C	VEGFR-2 ve 3	Lenfanjiogenez
VEGF-D	VEGFR-2 ve 3	Lenfanjiogenez
VEGF-E	VEGFR-2	Anjiogenez
PIGF	VEGFR-1, NP-1	Anjiogenez ve inflamasyon
VEGF-F	VEGFR-2	Anjiogenez

### **VEGF-C HAKKINDA GENEL BİLGİ**

VEGF-C öncül protein olarak üretilir ve intrasellüler sekretuar proprotein konvertazlar olan furin, PC-5 ve PC-7 tarafından aktive edilir. VEGF-C messenger RNA (mRNA) transkripsiyonu endotel hücrelerinde proinflamatuvar sitokinlere cevap olarak başlar. VEGF-C mRNA, TNF $\alpha$  ve interlökin 1 (IL-1) ile aktive olur. VEGF-C, VEGFR-3 ile kompleks yaparak lenfanjiyogenezi uyarmaktadır. VEGF-C, 46 kDa ağırlığında olup 419 aminoasitten oluşur. Normal şartlarda kalp, plasenta, kas, over ve ince barsaklarda eksprese olur. VEGF-C geni dördüncü kromozomun uzun kolundadır (4q34). VEGFR-3 embriyonik yaşamda kardiyovasküler sistemin gelişiminde önemli rol oynar. VEGF-C/VEGFR-2 kompleksinin kısmi anjiyogenik etkisi de mevcuttur. Bu özelliği, normal şartlarda lenfatik damardan yoksun fare kornea dokusunda VEGF-C aracılı lenfanjiyogenezin gösterilmesiyle farkedilmiştir. bFGF-2, deneysel çalışmalarda vasküler endotel hücrelerinde ve perivasküler stromal hücrelerden VEGF-C salınımını artırmak suretiyle lenfanjiyogenezi destekleyen bir diğer moleküldür. VEGF-C ligandı için spesifik olan VEGFR-3 sadece lenfatik endotel hücrelerinde bulunur. Bu özelliği nedeniyle



lenfanjiyogenez çalışmalarında kullanılan spesifik bir belirleyici haline gelmiştir. VEGFR-3'e karşı geliştirilen monoklonal antikorlar ile muamele sonrasında lenfanjiyogenezin inhibe olması, bu reseptörün lenfanjiyogenezde temel düzenleyici olduğunun göstergesidir. VEGF-C kan damarlarına ait endotel hücrelerini uyararak lenfatik yeni damar oluşumunu sağlamaktadır. Buradan anlaşılacağı gibi, anjiyogenez olmaksızın lenfanjiyogenezisin gerçekleşmesi zordur. Buna rağmen halen açıklanamamış birtakım sorular vardır. Lenfanjiyogenezde orijin hangi hücrelerdir? Kan damarlarının endotel hücreleri mi yoksa önceden varolan lenfatik damar endotel hücreleri mi kaynaktır? Konu net değildir ve intratümöral ya da peritümöral lenfatiklerin kaynak olduğunu iddia edenler de vardır (92–96).

Bir çok solid tümörde bölgesel lenf nodlarının invazyonu, prognoza olumsuz katkıda bulunur ve uzak metastaz habercisidir. Bölgesel lenf nodu tutulumu tedavi stratejilerini etkileyen bir durumdur. Çeşitli tümör tiplerinde yapılan çalışmalarda, VEGF-C ekspresyonu ile lenfatik vasküler invazyon, bölgesel lenf nodu metastazı, uzak metastaz, relapssız sağkalım ve toplam sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişkiler saptanmıştır. Bu özelliği nedeniyle intratümöral VEGF-C ekspresyonu, üzerinde çalışılması gereken bir husustur (95). Qingchang ve arkadaşlarının 2003 yılında yayınladıkları bir çalışmada küçük hücreli dışı akciğer kanserinde (KHDAK) VEGF-C ve VEGFR–3 lenfanjiogenez, anjiogenez ve akciğer kanserinin oluşması ve gelişmesiyle ilişkili bulunmuştur (97).

VEGF-C tümör hücrelerinin dışında, tümör stromasındaki fibroblastlar ve TİM tarafından da salgılanmaktadır. VEGF-C, kimyasal yapı olarak VEGF-A'nın ana yapısından amino ve karboksil gruplarının çıkmasıyla oluşur. İntrasellüler boşlukta gerçekleşen bu süreç, sonuçta saf, fonksiyonel VEGF-C üretimiyle sonlanabildiği gibi, bazen uygun olmayan tepkimeler nedeniyle, atipik, nonfonksiyonel bir protein şeklinde de salgılanabilir. Bu ikinci form lenfanjiyogenez üzerine herhangi bir etkiye sahip değildir. Ancak deneysel çalışmalarda kullanılan yöntemlerle VEGF-C 'nin pozitif olarak yorumlanmasına yol açar. Bu yüzden her zaman VEGF-C'nin tümör hücrelerinde yüksek oranda pozitif olması, o tümörün metastaz potansiyelinin

de yüksek olduğu anlamına gelmez. Bunun dışında VEGFR–3 homojen bir reseptör değildir. VEGF-C ile kompleks yapamayan izoformları da olabilir. VEGFR-3'ün uzun ve kısa olmak üzere iki izoformu vardır. Bu izoformlar VEGF-C ligandı ile birleştiğinde farklı sinyal iletiyor olabilir (98-100).

Şu ana kadar çalışılan tüm kanserlerin büyük çoğunluğunda VEGF-C ekspresyonu artmıştır. Meme ve prostat kanserinde VEGF-C ile lenf nodu metastazı arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Aynı şekilde over kanseri, oral kavite epidermoid karsinomu, kolorektal kanserler, mide kanseri, mesane kanseri, özefagus kanserinde de aynı bulgular elde edilmistir. Deneysel modellerde, VEGF-C'nin pankreatik islet hücre tümörlü transgenik farelerde lenfanjiogenesis ve lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bir başka çalışmada VEGF-C ve COX–2 üreten gastrik tümör dokularının daha yüksek lenfatik invazyon ve metastatik potansiyele sahip olduğu gözlenmiştir (101-108).

İlk kez Suzuki ve arkadaşları VEGF-C'nin mesane kanserinde pelvik lenf nodu metastazı için önemli bir predictive faktör olduğunu saptamıştır (109). Miyata ve arkadaşları yüzeysel mesane kanserlerinde, VEGF-C ile düzenlenen lenfangiogenesisin metastazsız sağkalım ile ilişkili olduğunu bulmuştur (88). Zu ve arkadaşları mesane tümörlerinde VEGF-C ekspresyonu ile kötü prognoz ve lenf nodu metastazı oluşumu arasında ilişki saptamışlardır (110). Mylona ve arkadaşlarının çalışması 123 mesane ÜK olgusundan oluşan geniş bir seri olup, bu çalışmada VEGF-C, tümör evresi ile ters olarak korele bulunmuştur (111).

## **VEGF-D HAKKINDA GENEL BİLGİ**

VEGF-D yapısal olarak %48 oranında VEGF-C'ye benzer bir glikoproteindir. 354 aminoasitten oluşur. Tıpkı VEGF-C gibi proprotein olarak üretilir. VEGF-D normal şartlarda, erişkin insanda, vasküler endotel, kalp, iskelet kası, akciğer ve barsaklardan eksprese edilir. VEGF-D geni, 2.0 kb boyutunda olup, X kromozomunun uzun kolunda lokalizedir (Xp22.31).

VEGF-D'nin olgun formu VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanır ve bunların aktivasyonu ile endotel hücreleri için anjiogenik, mitojenik ve lenfanjiogenik olarak işlev görür. En fazla embriyogenezis döneminde akciğer ve deride bulunur (112). VEGF-D bazı kanserlerde lenfangiogenesis ve lenf nodu metastazı ile ilişkili bulunmuştur (113). VEGF-D ekspresyonu kolorektal (114), over (115), endometrium (116), ve meme kansinolarında (117), melanomda (118), mesane kanserinde (88, 119) saptanmıştır.

Yong Ma ve ark. mesane kanserlerinde yaptığı bir çalışmada, VEGF-D ekspresyonu, lenfanjiogenesis, bölgesel lenf nodlarına yayılım ve rekürrens ile ilişkili bulunmuştur (86). Gontero ve ark. (120) ile Herrmann ve ark. çalışmalarında (119) VEGF-D ekspresyonu lenfatik yayılım ve progresyon ile ilişkili bulunmuştur. Miyata ve ark. yaptığı çalışmada ise VEGF-D yalnızca LDY ile ilişkili bulunmuştur (88).

## GEREÇ VE YÖNTEM

### 1. Olgular

Çalışmamızda, 1997-2010 yılları arasında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı ve Üroloji Anabilim Dalı'nda hasta takip dosyalarında kayıtlı izlemi bulunan 121 olgu ve 2007-2009 yılları arasında izlemi bulunmayan 63 olgu olmak üzere toplam 184 olgu değerlendirildi. TUR materyalleri değerlendirilen bu olguların 12'si DMPPÜN, 84'ü düşük dereceli papiller üroteliyal karsinom (DDPÜK), 88'i yüksek dereceli papiller üroteliyal karsinom (YDPÜK) tanısı aldı. Ayrıca TUR materyalinde karsinoma in situ tanısı alan 3 olgu ve sistektomi materyallerinden örneklenen 5 in situ odağı değerlendirmeye alındı. Takipli hastalardan, en az 1 ay içinde, tekrar TUR biopsilerinde DMPPÜN veya ÜK tanısı alan 71 hasta nüks olarak kabul edildi. Olguların yaş, cinsiyet, takip durumu, nüks varlığı, nüks süresi ve nüksün progresyonu gibi bilgileri patoloji raporlarından ve hasta takip dosyalarından elde edilerek kaydedildi. Olguların histolojik derece ve invazyon derecesinde artışı progresyon olarak kabul edildi. Üroteliyal karsinom nedeniyle sistektomi yapılan olguların sistektomi materyallerinden, tümör bulunmayan 7 trigon, 7 posterior, 8 kubbe, 8 anteriora ait olağan mukoza örnekleri seçildi.

Hematoksilen&eoziin preparatlar, WHO/ISUP 2004 derecelendirme sistemine göre tekrar değerlendirildi. Buna göre arşivimizde üroteliyal papillom tanısı alan 2 olgu DMPPÜN olarak değerlendirildi. Non-invaziv tümörler karsinoma in-situ, DMPPÜN, düşük dereceli ve yüksek dereceli olarak ayrıldı. İnvaziv tümörlerde lamina propria invazyonu ve muskularis propria invazyonu not edildi. İnvaziv tümörler de histolojik olarak düşük dereceli ve yüksek dereceli olarak ayrıldı.

Blok seçiminde, kanama, nekroz ve koter artefaktı içermeyen, lamina propria içeren alanlar olmasına dikkat edildi.

## **2. İmmunhistokimyasal Boyama Yöntemi**

Seçilen tüm bloklara, D2-40, VEGF-D ve VEGF-C immunhistokimyasal boyaları uygulandı. D2-40 için pozitif kontrol meme dokusu, deri altı lenfatikleri kullanıldı. VEGF-C ve VEGF-D için pozitif kontrol olarak plasenta kullanıldı.

### ***İmmünohistokimyasal D2-40 Boyama Tekniği***

Yöntem sırasıyla şöyleydi:

a) Deparafinizasyon: Parafin bloklardan dört mikron kalınlığında alınan kesitler polilizinli özel lamlara alınarak, 55°C'lık etüvde 45 dakika, parafin eriyinceye kadar tutularak daha sonra ksilol ve alkol serilerinden geçirilmek kaydıyla deparafinize edildi.

b) Endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için 10 dakika distile su içinde hazırlanmış % 3 hidrojen peroksid blok içinde inkübe edildi.

c) Sitrat bufferda (pH: 6), basınçlı kap içinde 3 dakika kaynatıldı.

d) Tris tampon solüsyonunda (TBS) (pH: 7.4) beş dakika yıkandı.

f) 30 dakika kullanıma hazır, monoklonal fare antikor D2-40 (DAKO, klon, M3619) ile muamele edildi.

g) Otuz ile kırk dakika sonra oda ısısına gelince TBS'de beş dakika yıkandı.

h) Biotinylated goat anti-mouse (Lab Vision, TM-125-BN) sekonder antikor ile 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.

i) TBS'de 4 kez yıkandı.

j) Daha sonra enzim olarak streptavidin peroksidaz (Lab Vision, TS -125-HR) ile 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.

k) TBS'de 4 kez yıkandı.

l) Son olarak kromojen olarak diaminobenzidin (DAB, K4006) ile 10 dakika inkübe edildi.

m) Mayer's hematoksilin ile 1–2 dakika boyunca zıt boyama yapıldı.

n) Çeşme suyu ve distile suda 3'er dakika yıkandı. Alkollerden geçirilen lamlar kurutulduktan sonra şeffaflandırma işlemi için ksilolden geçirildi ve Entellan® (Merck and Co., Berlin) ile kapatıldı.

### ***İmmünohistokimyasal VEGF-C Boyama Tekniği***

Yöntem sırasıyla şöyleydi:

a) Deparafinizasyon: Parafin bloklardan dört mikron kalınlığında alınan kesitler polilizinli özel lamlara alınarak, 55°C'lık etüvde 45 dakika, parafin eriyinceye kadar tutularak daha sonra ksilol ve alkol serilerinden geçirilmek kaydıyla deparafinize edildi.

b) Endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için 10 dakika distile su içinde azırılmış % 3 hidrojen peroksid blok içinde inkübe edildi.

c) Sitrat bufferda (pH: 6), basınçlı kap içinde 3 dakika kaynatıldı.

d) Tris tampon solüsyonunda (TBS) (pH: 7.4) beş dakika yıkandı.

e) Bunun ardından nonspesifik boyamaları elimine etmek için Ultra V Block uygulandı ve 10 dakika inkübe edildi.

f) Kesitlere 200 µg konsantre tavşan antikoru (Santa Cruz, poliklonal, sc-9047) ile 1:125 oranında dilüe edilerek 2 gece +4 °C inkübasyon süresi uygulandı.

g) Otuz ile kırk dakika sonra oda ısısına gelince TBS'de beş dakika yıkandı.

h) Biotinylated goat anti-mouse (Lab Vision, TM-125-BN) sekonder antikor ile 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.

i) TBS'de 4 kez yıkandı.

j) Daha sonra enzim olarak streptavidin peroksidaz (Lab Vision, TS -125-HR) ile 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.

k) TBS'de 4 kez yıkandı.

l) Son olarak kromojen olarak diaminobenzidin (DAB, DAKO, K4011) ile 10 dakika inkübe edildi.

m) Mayer's hematoksilen ile 1–2 dakika boyunca zıt boyama yapıldı.

n) Çeşme suyu ve distile suda 3'er dakika yıkandı. Alkollerden geçirilen lamlar kurutulduktan sonra şeffaflandırma işlemi için ksilolden geçirildi ve Entellan® (Merck and Co., Berlin) ile kapatıldı.

### ***İmmünohistokimyasal VEGF-D Boyama Tekniği***

Yöntem sırasıyla şöyleydi:

a) Deparafinizasyon: Parafin bloklardan 4 mikron kalınlığında alınan kesitler pozitif yüklü özel lamlar üzerine alındı. Lamlar 55°C'lık etüvde 1 saat parafin eriyinceye kadar tutuldu.

b) Tüm preparatlar boyama işlemi için tam otomatik immunhistokimyasal boyama cihazına (Ventana, Benchmarck, XT) yerleştirildi.

c) Cihaz ile uyumlu immunhistokimyasal kit (DAB substrat sistem, AEC detection kit, EZ prep, LCS, SSC solüsyonları, RBS, amplifikasyon, proteaz, blok solüsyonları, Mayer hematoksilen) kullanılarak işlemden geçirildi.

d) Kesitlere 200 µg konsantre tavşan antikoruna (Santa Cruz, poliklonal, sc-13085) ile 1:50 oranında dilüe edilerek 2 saat inkübasyon süresi uygulandı.

e) Lamlar deterjanlı su ile yıkayıp alkol serilerinden geçirildi.

f) Şeffaflandırma işlemi için ksilolden geçirildi ve Entellan® (Merck and Co., Berlin) ile kapatıldı.

### **3. İmmunhistokimyasal sonuçların değerlendirilmesi**

Tüm değerlendirmeler standart ışık mikroskopunda yapıldı.

D2-40 immunreaktivitesi, seçici olarak lenfatik endotel hücrelerinde ve myofibroblast ve fibroblast gibi stromal hücrelerde gözlemlendi. Lenfatik endotel

hücrelerinde, güçlü sitoplazmik ve membranöz boyanma görüldü. Tümör hücrelerinde ve kan damarlarında pozitif boyanmaya rastlanmadı.

D2-40 boyalı bütün preparatlardan 4'lük objektifte (4x10) lenfatik damar yoğunluğunun en fazla olduğu 3 aktif alan (hot spot) seçildi. Bu alanlarda 20'lik objektifte (x200) damar sayımı yapıldı. Bu alanların tamamen lamina propriayı içeren stromal alanlardan oluşmasına dikkat edildi. Seçilen alanda tümörün bulunması durumunda Olympus, DP2-BSW, versiyon (1.2, Build 2738) bilgisayar programı ile tümör periferinden çizim yapılarak stromal alan boyutu (mm<sup>2</sup>) belirlendi. Bu stromal alanlarda lenfatik damar sayısı aynı bilgisayar programı ile işaretlenerek sayıldı. Her bir olgu için toplam damar sayısı toplam alan miktarına bölünerek mm<sup>2</sup>'e düşen damar sayısı saptandı. Bu oran lenfatik damar yoğunluğu (LDY) olarak değerlendirildi.

VEGF-C immunreaktivitesi reaktif damar endotel hücrelerinde, mononükleer ve polimorfonükleer yangı hücrelerinde, eritrositlerde, bazen mesane düz kasında pozitif saptandı. Tümör hücrelerinde çoğunlukla sitoplazmik ve bazen de nükleer boyanma izlendi. İmmunhistokimyasal belirteç için boyanmanın yoğunluğu ve lezyon içindeki dağılımı göz önüne alınarak, negatif (0), pozitif (1) olarak değerlendirildi. Fokal ve hafif boyanma negatif olarak değerlendirildi. VEGF-D immunreaktivitesi reaktif damar endotel hücrelerinde, mononükleer ve polimorfonükleer yangı hücrelerinde, eritrositlerde, bazı olgularda mesane düz kasında pozitif saptandı. Tümör hücrelerinde çoğunlukla sitoplazmik ve bazen de nükleer boyanma izlendi. İmmunhistokimyasal belirteç için boyanmanın yoğunluğu ve lezyon içindeki dağılımı göz önüne alınarak, negatif (0), pozitif (1) olarak değerlendirildi. Fokal ve hafif boyanma negatif olarak değerlendirildi.

#### **4. İstatistiksel değerlendirme**

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde kişisel bilgisayarda çalışan SPSS (Statistical Package for Social Sciences) programının 15.0 versiyonu kullanıldı. Korelasyonun araştırılmasında Pearson ve Spearman korelasyon analizi, farklı serilerin anlamlılığının sınıanmasında Fischer exact test ve



grupların birbirlerine göre ilişkilerinin saptanmasında One-Way Anova kullanıldı. Sonuçlar  $p < 0.05$  olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Çalışmamızda, 1997-2010 yılları arasında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı ve Üroloji Anabilim Dalı'nda hasta takip dosyalarında kayıtlı toplam 184 olguya ait transüretal rezeksiyon (TUR) materyalleri yeniden değerlendirildi. 121 olgunun 1 ay ile 208 ay arasında izlemi bulunuyordu. 63 olgunun ise izlemi bulunmuyordu. Bu olgular WHO/ISUP 2004 sınıflama sistemine göre, DMPPÜN, DDPÜK, YDPÜK olarak yeniden sınıflandırıldı. Ayrıca TUR materyallerinden 3, sistektomi materyallerinden 5 olmak üzere toplam 8 karsinoma in situ olgusu ile sistektomi materyallerinden seçilen, trigon bölgesinden 7, kubbeden 8, anterior duvardan 8, posterior duvardan 7 adet olmak üzere toplam 30 adet olağan mukoza örnekleri çalışmaya katıldı. Tüm olgular histopatolojik ölçütler yanı sıra, D2-40, VEGF-C, VEGF-D ekspresyonu açısından incelendi.

### 1. Histopatolojik Özellikler

Çalışmaya alınan 8 CİS, 12 DMPPÜN, 84 DDPÜK, 88 YDPÜK ve 30 olağan mukoza olgusuna ait hematoksilen eozin boyalı kesitler değerlendirildi. Papiller lezyonlar histolojik derece ve invazyon açısından yeniden sınıflandırıldı.

#### *Karsinoma in-situ*

Olguların 3'ü TUR materyaline ait olup 5'i sistektomi materyallerinden örneklenmişti. Hematoksilen&Eozin (HE) kesitlerde epitelde sınırlı hücre çekirdeklerinde belirgin irileşme, pleomorfizm ve hiperkromazi ve ek olarak lamina propriada vaskülarite artışı, ödem ve inflamasyon izlendi Epitelin üst tabakalarına kadar uzananabilen atipik mitozlar görüldü (Resim 1, 2).

### *Düşük Malignite Potansiyelli Papiller Üroteliyal Neoplazm*

Çalışmamızda bulunan 12 DMPPÜN olgularının tümü histopatolojik olarak minimal yapısal anormallikler ve minimal nükleer atipi içeren ürotelyumun döşediği papiller yapılarla karakterliydi. Bu epitel hiperplastik ürotelyuma benzer görünümdeydi (Resim 3). Papiller yapılarda bir miktar yapısal ve sitolojik atipi izlendi (Resim 4). Oldukça seyrek ve genellikle bazal tabakaya sınırlı mitozlar izlendi.

### *Düşük Dereceli Papiller Üroteliyal Karsinom*

Histopatolojik olarak küçük büyütmeye kolaylıkla tanınabilen yapısal ve/veya sitolojik varyasyonlar (polarite; nükleer büyüklük, biçim ve kromatin yapısındaki varyasyonlar) içeren papiller yapılar izlendi (Resim 5-6). Az sayıda ve genellikle epitelin alt yarısına sınırlı mitozlar izlendi. Çalışmamızda bulunan toplam 84 DDPÜK olgusunun 56'sı non invaziv olup 26'sı LP invazyonu, 2'si MP invazyonu gösteriyordu.

### *Yüksek Dereceli Papiller Üroteliyal Karsinom*

Histopatolojik olarak küçük büyütmeye bütünüyle ya da baskın olarak düzensiz görünüm ile karakterli papiller yapılar izlendi. Yapısal olarak hücreler düzensiz kümeler ya da gruplar oluşturmuştu. Sitolojik olarak orta/belirgin derecede pleomorfizm nükleer kromatin kabalaşması ve belirgin nükleolus izlendi (Resim 7). Tüm tabakalarda kolayca saptanabilen atipik mitozlar izlendi. Çalışmamızda bulunan toplam 88 YDPÜK olgusunun 5'i non invaziv olup 46'sı LP invazyonu, 37'si MP invazyonu gösteriyordu (Resim 8).

## 2. Olguların Yaş ve Cinsiyet Dağılımı

Çalışmaya alınan olguların cinsiyet dağılımı Tablo 1’de gösterildi. DMPPÜN olgularının 1’i kadın, 11’i erkek hastadan, ÜK’li olguların (DDPÜK+YDPÜK) 14’ü kadın, 158’i erkek hastadan oluşuyordu. Karsinoma insitu olgularının ve normal mukoza örneklerinin tamamı erkek hastaydı.

**Tablo 1:** Olguların sayı ve cinsiyet dağılımı

TANI	OLGU		
	SAYI	CİNSİYET	
		KADIN	ERKEK
NORMAL MUKOZA	30	0	30
KARSİNOMA İNSİTU	8	0	8
DMPPÜN	12	1	11
DDPÜK	84	11	73
YDPÜK	88	3	85
<b>TOPLAM</b>	<b>222</b>	<b>15</b>	<b>207</b>

Olguların yaşları 4 ile 86 arasında değişmekte olup (ort.  $65 \pm 0,90$ ), en büyük olgu grubunun yedinci ve sekizinci onyılıda bulunduğu görüldü (Tablo 2). Olguların yaşı arttıkça tümörün histolojik derecesi ( $p < 0,001$ ) ve invazyon derecesi (pT) artıyordu ( $p = 0,01$ ).

**Tablo 2:** Papiller üroteliyal neoplazi (DMPPÜN, DDPÜK, YDPÜK) olgularının yaş dağılımı

<b>YAŞ GRUPLARI</b>	<b>TOPLAM (%)</b>
0-9	1 (%0,5)
10-19	0 (%0)
20-29	0 (%0)
30-39	4 (%2,2)
40-49	14 (%7,6)
50-59	37 (%20,1)
60-69	55 (%29,9)
70-79	53 (%28,8)
80-89	20 (%10,9)
<b>TOPLAM</b>	<b>184 (%100)</b>

Papiller üroteliyal neoplazi (PÜN) olgularının %8,15'i kadın, %91,85'i erkek hastadan oluşuyordu. Olguların 12'si (%6,5) DMPPÜN, 84'ü (%45,7) DDPÜK, 88'i (%47,8) YDPÜK tanısı aldı. Tüm olguların 73'ü (%39,6) non-invaziv, 111'i (%60,4) invaziv olarak değerlendirildi (Tablo 3).

**Tablo 3:** PÜN'lü Olguların Tanı ve Cinsiyet Dağılımı

TANI	OLGU SAYISI		TOPLAM (%)
	KADIN	ERKEK	
<b>DMPPÜN</b>	1	11	12 (%6,5)
<b>DDPÜK</b>	11	73	84 (%45,7)
Non invaziv	9	47	56 (%30,4)
LP invazyonu	2	24	26 (%14,1)
Kas invazyonu	0	2	2 (%1,2)
<b>YDPÜK</b>	3	85	88 (%47,8)
Non invaziv	0	5	5 (%2,7)
LP invazyonu	1	45	46 (%25)
Kas invazyonu	2	35	37 (%20,1)
<b>TOPLAM (%)</b>	15 (%8,15)	169 (%91,85)	184 (%100)

Erkek olgular ile kadın olgular arasında histolojik derece ve invazyon açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi.

### 3. Olguların Nüks Durumu

İzlemi bulunan 122 olgunun 71'i (%58,19) nüks göstermişti (Tablo 4). DMPPÜN tanısı alan 2 hasta (%1,64), DDPÜK tanısı alan 32 hasta (%26,23), YDPÜK tanısı alan 36 hasta (%29,50) nüks etti. Nükslü ve nüksüz gruplar arasında histolojik derece ( $P=0,006$ ) ve invazyon derecesi açısından anlamlı fark bulundu ( $p=0.000$ ). Nükslü grupta, nüksüz gruba göre histolojik derece ve invazyon daha yüksekti.

**Tablo 4:** Olguların Nüks durumu

<b>TANI</b>	<b>NÜKSLÜ</b>	<b>NÜKSSÜZ</b>	<b>TOPLAM (%)</b>
<b>CIS</b>	1 (%0,82)	1 (%0,81)	2 (%1,64)
<b>DMPPÜN</b>	2 (%1,64)	5 (%4,10)	7 (%5,73)
<b>DDPÜK</b>	32 (%26,23)	30 (%24,60)	62 (%50,83)
Non invaziv	18	24	42
LP invazyonu	13	6	19
Kas invazyonu	1	0	1
<b>YDPÜK</b>	36 (%29,50)	15 (%12,30)	51 (%41,80)
Non invaziv	1	4	5
LP invazyonu	24	10	34
Kas invazyonu	11	1	12
<b>TOPLAM (%)</b>	71 (%58,19)	51 (%41,81)	122 (%100)

#### **4. Olguların Nüks ve Progresyon Durumu**

Olguların DMPPÜN'den DDPÜK'e ve DDPÜK'den YDPÜK'e nüksü "histolojik derece progresyonu" olarak kabul edildi. Histolojik derecesi ne olursa olsun, non invazivden LP/MP invazyonu gösteren, LP invazyonundan MP invazyonuna nüks gösteren olgular "invazyon progresyonu" olarak alındı. Nüks gösteren DMPPÜN ve DDPÜK'li toplam 34 olgunun 11'i histolojik derece progresyonu gösteriyordu (Tablo 5).

**Tablo 5:** DMPPÜN, DDPÜK nüklü olguların histolojik derece progresyonu

İLK TANI	NÜKS TANISI				
	N	DMPPÜN	DDPÜK	YDPÜK	PROGRESYON
DMPPÜN	2	1	1	0	%50
DDPÜK	32	2	20	10	%31,25
TOPLAM	34	3	21	10	%32,35

Tüm nüklü olguların 18'i invazyon açısından progresyon gösteriyordu (Tablo 6).

**Tablo 6:** Nüklü olguların invazyon progresyonu

İNVAZYON	İNVAZYON				PROGRESYON (%)
	N	Non invaziv	LP invazyonu	MP invazyonu	
Non invaziv	22	15	5	2	%31,81
LP invazyonu	36	7	18	11	%30,55
TOPLAM	58	22	23	13	%32,75

## 5. D2-40 ile Saptanan Lenfatik Damar Yoğunluğu Dağılımı

### *Olağan Mukoza LDY*

Olağan mukozada D2-40 ekspresyonu izlenmez iken lenfatik damarlarda D2-40 ekspresyonu izlendi (Resim 9). 30 adet olağan mukoza örneğinin LDY'si minimum 3,70, maksimum 33,60 olup ortalama  $17,60 \pm 7,07$  olarak



değerlendirildi. LDY'si en fazla olan mukoza örneği trigon olarak değerlendirildi. Olağan mukoza LDY'likleri Tablo 7'de verildi.

**Tablo 7:** Olağan mukoza lokalizasyonlarına göre LDY dağılımı

NORMAL BÖLGE	LDY					
	N	Ortalama	Ortanca	Min.	Maks.	Std. Sapma
Anterior	8	16,67	18,20	12,10	20,50	3,64
Posterior	7	16,25	16,80	3,70	32,70	9,51
Kubbe	8	15,75	14,95	8,40	23,30	5,42
Trigon	7	22,12	21,50	11,20	33,60	8,33
<b>TOPLAM</b>	30	17,60	17,70	3,70	33,60	7,07

Normal mukoza, CİS, DMPPÜN, DDPÜK, YDPÜK'lu olguların LDY dağılımı Tablo 8'de verildi.

**Tablo 8:** Olguların lenfatik damar yoğunluğu dağılımı

TANI	LDY					
	TOPLAM (N= 222)	Ortalama	Ortanca	Min.	Maks.	Std. Sapma
Normal	30	17,60	17,70	3,70	33,60	7,07
CİS	8	28,35	25,65	24,30	43,90	6,54
DMPPÜN	12	71,10	51,40	6,50	287,10	74,890
DDPÜK	84	59,63	38,30	9,30	485,10	72,49
YDPÜK	88	80,87	57,90	14,90	958,90	113,75

Normal mukoza ve neoplastik oluşumlarda bulunan LDY karşılaştırıldığında, normal mukozada LDY'nin daha düşük olduğu saptandı (p=0,003). Olağan mukoza ve CİS'li olgularda bulunan LDY (Resim 10) karşılaştırıldığında olağan mukozada LDY daha düşük saptandı (p=0.000). CİS'li olgularda bulunan LDY düşük dereceli PÜN'lerde (DMPPÜN+DDPÜK) bulunan LDY ile karşılaştırıldığında CİS'te LDY'nin daha az olduğu saptandı

(p=0,006). CİS olgularının YDPÜK olgularıyla karşılaştırılmasında ise CİS'te LDY'nin daha az olduğu saptandı (p=0.000).

### **DMPPÜN ve ÜK'lerde LDY**

PÜN'lü olguların LDY'sinin değerlendirilmesinde stromal alanlar dikkate alındı ve LP alanı işaretlenerek mm<sup>2</sup> cinsinden ölçüldü (Resim 11-12). Bu alana giren D2-40 pozitif lenfatik damarlar sayıldı (Resim 13).

DMPPÜN'li olguların ortalama LDY'si 71,10±74,89 (Resim 14), DDPÜK'li olguların ortalama LDY'si 59,63±72,49 (Resim 15), YDPÜK'lu olguların ortalama LDY'si 80,87±113,75 (Resim 16) olarak değerlendirildi. DDPÜK ve YDPÜK olgu grupları içinde invazyon derecelerine göre LDY dağılımı Tablo 9'da verildi

**Tablo 9:** DMPPÜN ve ÜK'lerde lenfatik damar yoğunluğu

TANI	LDY					
	N	Ortalama	Ortanca	Min.	Maks.	Std. Sapma
<b>DMPPÜN</b>	12	71,10	51,40	6,50	287,10	74,89
<b>DDPÜK</b>	84	59,63	38,30	9,30	485,10	72,49
Non invaziv	56	62,38	37,15	9,30	485,10	85,56
LP invaziv	26	54,86	40,60	20,50	157,50	35,69
Kas invaziv	2	44,70	44,70	32,70	56,70	16,97
<b>YDPÜK</b>	88	80,87	57,90	14,90	958,90	113,75
Non invaziv	5	72,28	74,10	28,00	126,40	41,84
LP invaziv	46	66,10	59,80	14,90	174,80	32,47
Kas invaziv	37	100,40	52,30	28,00	958,90	170,52
<b>TOPLAM</b>	184	70,53	49,35	6,50	958,90	94,75

LDY ile histolojik derece arasında ( $p=0.000$ ) ve LDY ile invazyon derecesi arasında ( $p=0.001$ ) istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı. Histolojik derece ve invazyon derecesi arttıkça LDY artıyordu.

### ***Nüks, Progresyon ve LDY arasında ilişki***

Nükslü olguların LDY'si ortalama  $70,01 \pm 85,90$ , nüksüz olguların LDY'si  $61,51 \pm 46,21$  olarak saptandı (Tablo10).

**Tablo 10:** Nüks ve lenfatik damar yoğunluğu arasında ilişki

Nüks Durumu	LDY					
	N	Ortalama	Ortanca	Min.	Maks.	Std. Sapma
Nükslü	71	70,01	50,40	14,90	577,40	85,90
Nüksüz	50	61,51	47,45	16,80	287,10	46,21
<b>TOPLAM</b>	121	66,50	49,50	14,90	577,10	72,07

Nükslü grupta LDY ortalaması daha yüksekti ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Histolojik derece ve invazyon progresyonu gösteren ve göstermeyen olgular arasında LDY açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı.

## **6. Olguların VEGF-C ve VEGF-D Boyanma Özellikleri**

### ***Olguların VEGF-C boyanma özellikleri***

Normal mukozaya ait örneklerin 27'si VEGF-C ekspresyonu göstermez iken, 3'ünde belirgin- diffüz VEGF-C ekspresyonu saptandı (Resim 17). Olağan mukoza lokalizasyonlarına göre VEGF-C ekspresyonları Tablo 11'de gösterildi.

**Tablo 11:** Olağan mukoza VEGF-C boyanma özellikleri

<b>OLAĞAN MUKOZA</b>	<b>N</b>	<b>Negatif</b>	<b>Pozitif</b>
<b>Anterior</b>	8	8	0
<b>Posterior</b>	7	7	0
<b>Kubbe</b>	8	8	0
<b>Trigon</b>	7	4	3
<b>TOPLAM</b>	30	27	3

Olağan mukoza örneklerinden sadece trigonda VEGF-C ekspresyonu görüldü. Tüm olguların 174'ü VEGF-C ekspresyonu göstermez iken 48 olguda VEGF-C ekspresyonu saptandı (Tablo 12).

**Tablo 12:** Tanı gruplarına göre VEGF-C boyanma oranları

<b>TANI</b>	<b>N</b>	<b>Negatif</b>	<b>Pozitif</b>
<b>NORMAL</b>	30	27	3
<b>CIS</b>	8	8	0
<b>DMPPÜN</b>	12	7	5
<b>DDPÜK</b>	84	59	25
<b>YDPÜK</b>	88	74	14
<b>TOPLAM (%)</b>	222	175(%78,82)	47(%21,18)

DMPPÜN, DDPÜK ve YDPÜK'ler arasında histolojik tanı ile VEGF-C boyanma oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı saptandı. VEGF-C ekspresyonu arttıkça histolojik derece ( $p=0,026$ ) ve invazyon derecesi ( $p=0,034$ ) azalıyordu (Resim 18, 19).

### ***Nüks ve Progresyon ile VEGF-C ekspresyonu arasında ilişki***

Nükslü olguların 55'inde VEGF-C ekspresyonu bulunmaz iken 16'inde pozitif olarak saptandı. Nüksüz olguların 32'sinde VEGF-C ekspresyonu saptanmaz iken 19'unda pozitif olarak saptandı (Tablo 13).

**Tablo 13:** Nüks ve VEGF-C ilişkisi

<b>Nüks durumu</b>	<b>N</b>	<b>Negatif</b>	<b>Pozitif</b>
<b>Nükslü</b>	71	55	16
<b>Nüksüz</b>	51	32	19

Nükslü olgular ile nüksüz olgular arasında VEGF-C ekspresyonu daha düşük saptandı ancak bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0,056$ ).

### ***Olguların VEGF-D boyanma özellikleri***

Normal mukoza örneklerinin 20'si negatif, 10'u belirgin diffüz pozitif boyanma gösterdi (Resim 20). Normal bölge lokalizasyonlarına göre VEGF-D ekspresyonları Tablo 14'de gösterildi.

**Tablo-14:** Normal bölge lokalizasyonlarına göre VEGF-D boyanma oranları

<b>OLAĞAN MUKOZA</b>	<b>N</b>	<b>NEGATİF</b>	<b>POZİTİF</b>
<b>Anterior</b>	8	3	5
<b>Posterior</b>	7	6	1
<b>Kubbe</b>	8	6	2
<b>Trigon</b>	7	5	2
<b>TOPLAM</b>	30	20	10

Normal mukozaya ait örneklerde VEGF-D ekspresyonu en fazla anteriorda görüldü. Çalışmaya alınan olguların %68,01'inde VEGF-D ekspresyonu görülmedi (Tablo-15), (Resim 21,22).

**Tablo-15:** Tanı gruplarına göre VEGF-D boyanma oranları

<b>TANI</b>	<b>N</b>	<b>Negatif</b>	<b>Pozitif</b>
<b>Normal</b>	30	20	10
<b>Karsinoma insitu</b>	8	6	2
<b>DMPPÜN</b>	12	8	4
<b>DDPÜK</b>	84	54	30
<b>YDPÜK</b>	88	63	25
<b>TOPLAM (%)</b>	222	151 (%68,01)	71 (31,99%)

PÜN'lerde histolojik derece ve invazyon derecesi ile VEGF-D ekspresyonu arasında ilişki saptanmadı.

#### ***Nüks, Progresyon ve VEGF-D***

Nükslü olguların 19'unda pozitif boyanma görüldü (Tablo 16).

Nükslü olgular ile nüksüz olgular arasında VEGF-D ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı.

**Tablo-16:** Nüks ve VEGF-D ilişkisi

<b>Nüks durumu</b>	<b>N</b>	<b>Negatif</b>	<b>Pozitif</b>
<b>Nükslü</b>	71	52	19
<b>Nüksüz</b>	51	36	15

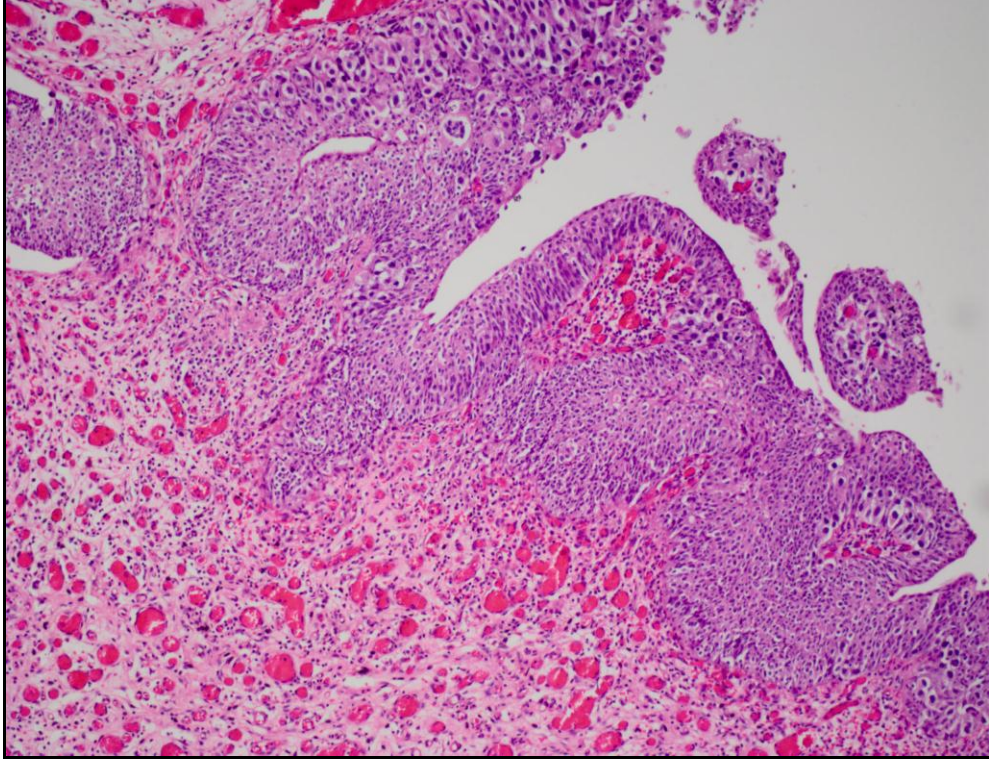
Nükslü olguların progresyonu ile VEGF-D ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Ayrıca nükslü olguların derece progresyonu ve invazyon progresyonu ile VEGF-D arasında ilişki saptanmadı.

## **7. LDY ile VEGF-C, VEGF-D ilişkisi**

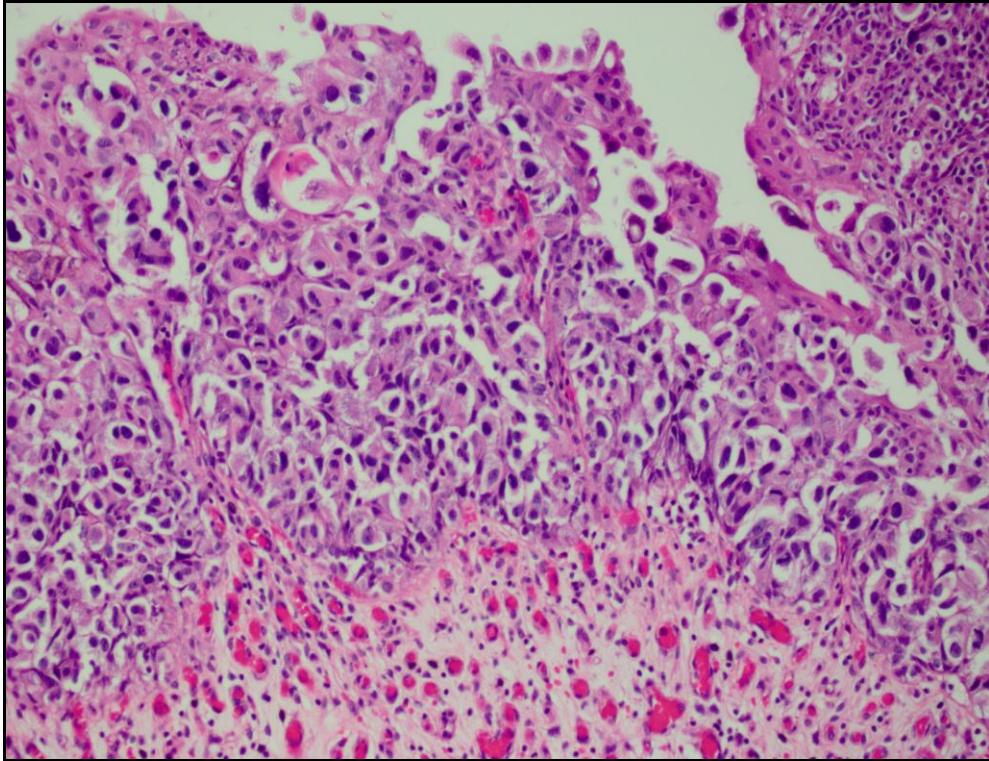
LDY ile VEGF-C, VEGF-D ilişkisini saptamak için doku örnekleri LDY düzeylerine göre median değerin (73,5) üstündekiler ve altındakiler olarak 2 gruba ayrıldı. VEGF-C, VEGF-D pozitif ve negatif örnekler ile bu gruplar karşılaştırıldı. PÜN'lü olgularda LDY ile VEGF-C ve VEGF-D ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı.

## **8. Olguların Primer Tümör ve Nükslerinde LDY, VEGF-C, VEGF-D Ekspresyonları**

Nükslü 34 olgunun ikinci nüks biopsileri de LDY, VEGF-C ve VEGF-D ekspresyonu açısından ilk biopsileri ile birlikte değerlendirildi. Bu olguların birinci ve ikinci biopsilerin VEGF-D ve VEGF-C ekspresyonlarında, 19 olgunun VEGF-D ekspresyonu aynı kalırken, 10 olgunun VEGF-D ekspresyonu azalmış, 5 olgunun VEGF-D ekspresyonu artmış olarak saptandı. 18 olgunun VEGF-C ekspresyonu aynı kalırken, 10 olgunun VEGF-C ekspresyonu azalmış, 6 olgunun VEGF-C ekspresyonu artmış olarak saptandı. Olguların birinci ve ikinci biopsilerinde ki VEGF-D ve VEGF-C ekspresyonları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. Ancak birinci ve ikinci biopsiler LDY açısından karşılaştırıldığında, ilk tanısında yüksek LDY'si bulunan olguların ikinci tanılarında da yüksek LDY'ye sahip olduğu saptandı (p=0,007).

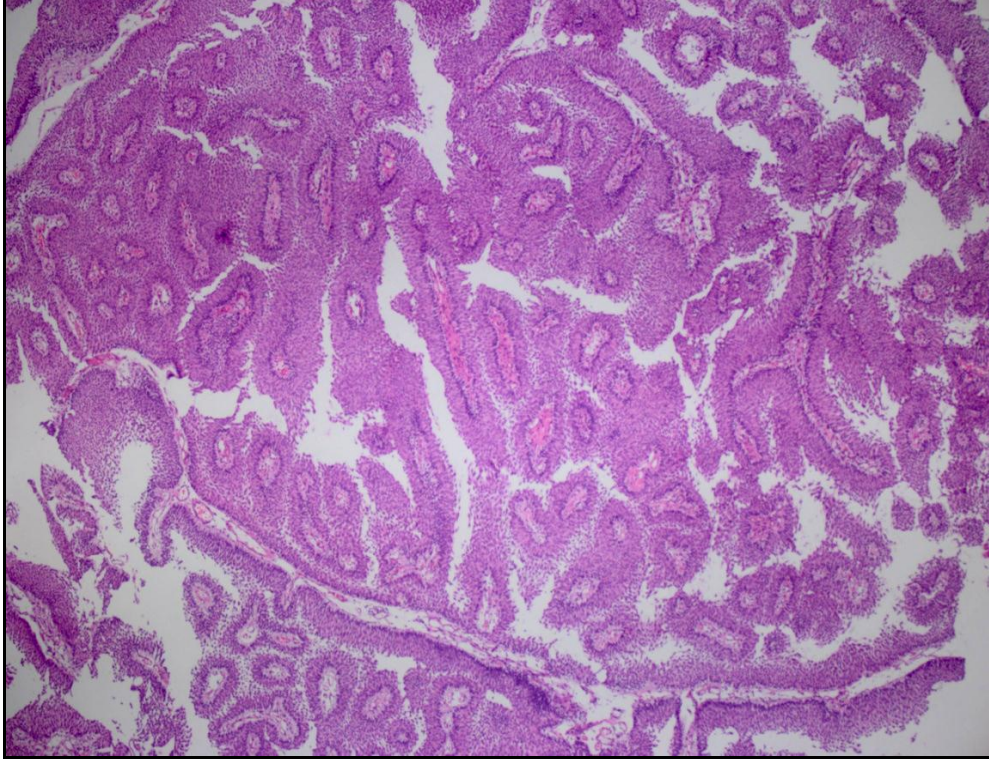


**Resim 1.** Epiteli tam kat tutan CIS (HE,x100)

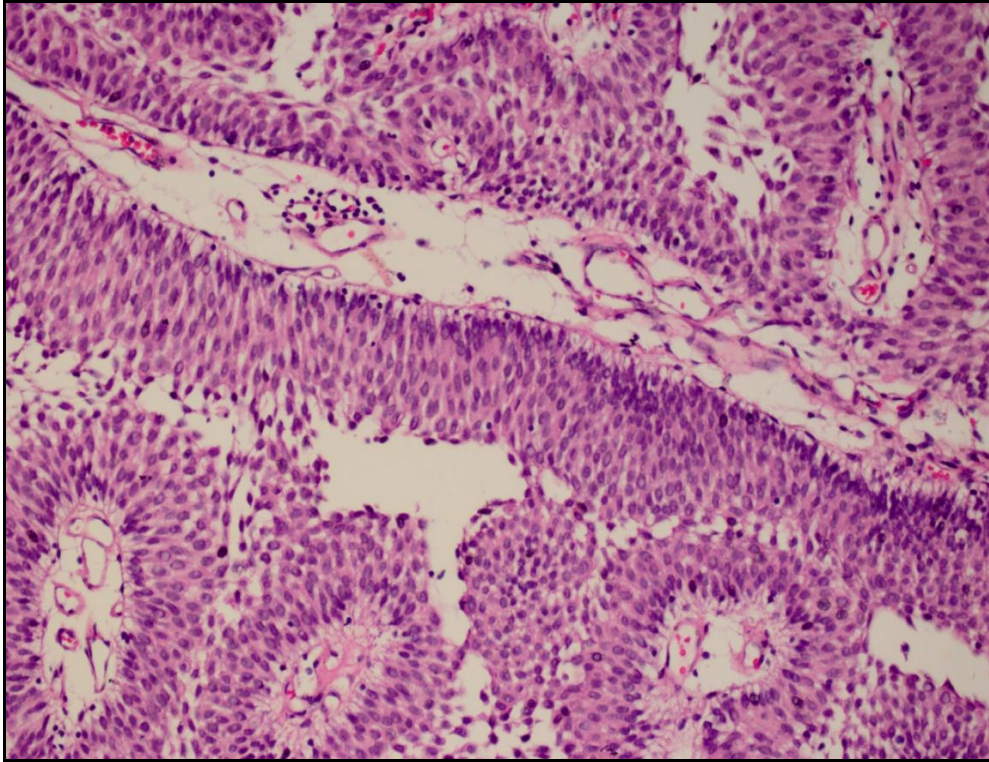


**Resim 2.** CIS' de hücrelerde belirgin atipi (HE,x200)



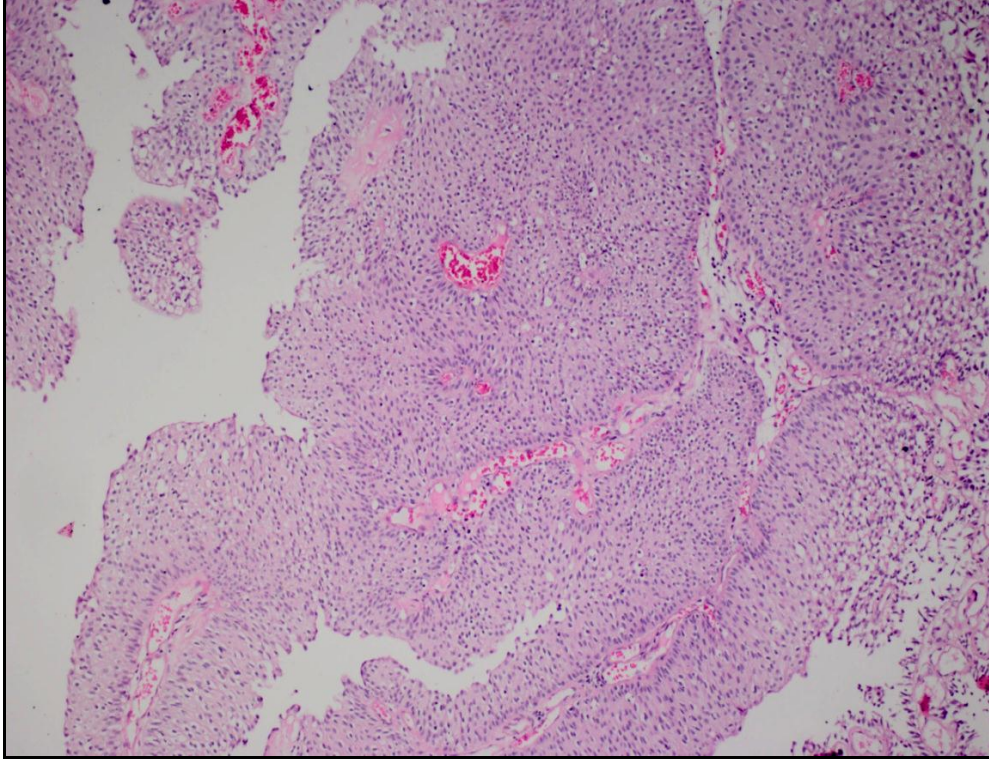


**Resim 3.** DMPPÜN'de hiperplastik ürotelyuma benzer epitel ile döşeli papiller yapılar (HE,x40)

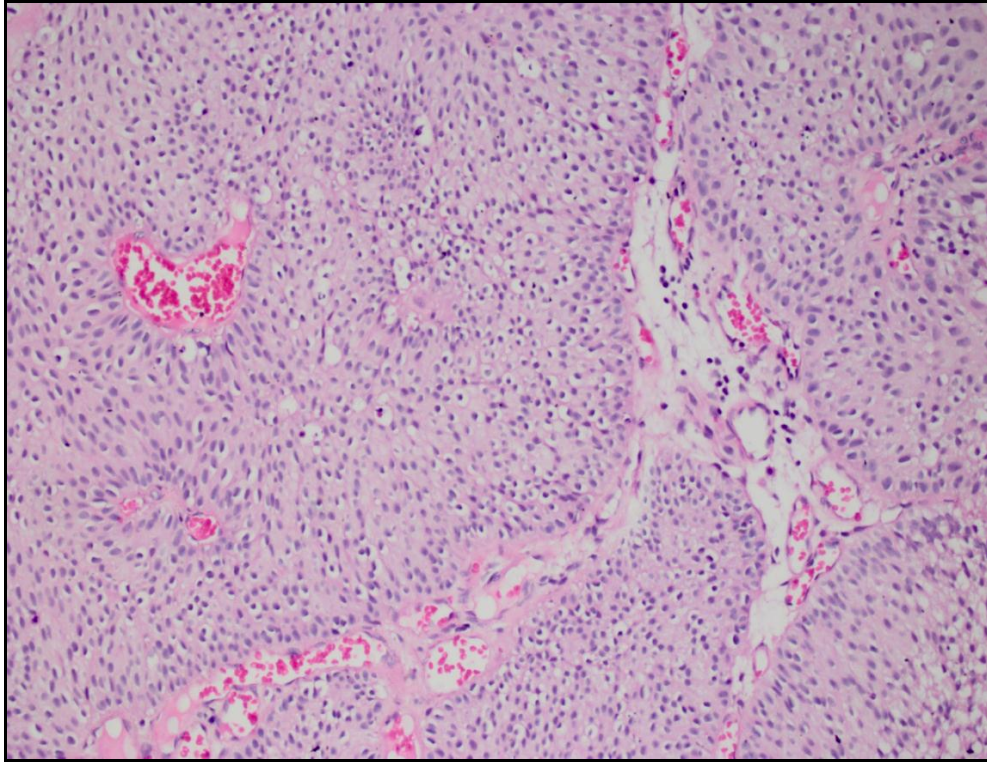


**Resim 4.** DMPPÜN'de minimal sitolojik atipi (HE,x400)



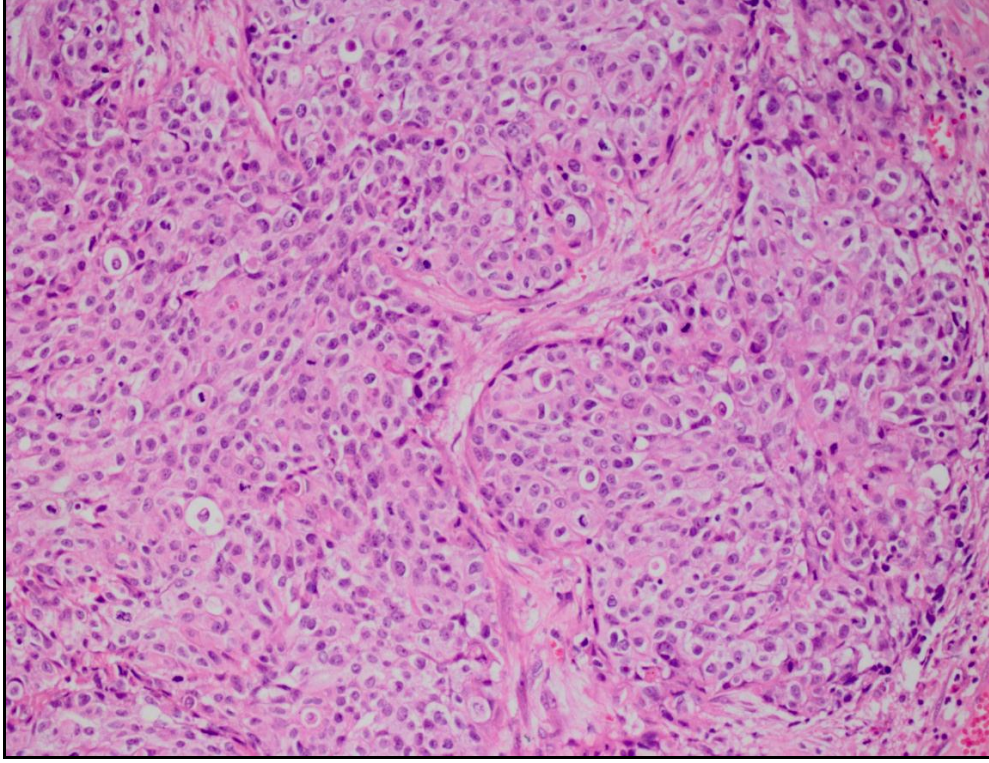


**Resim 5.** DDPÜK' de yapısal atipi içeren papiller yapılar (HE,x100)

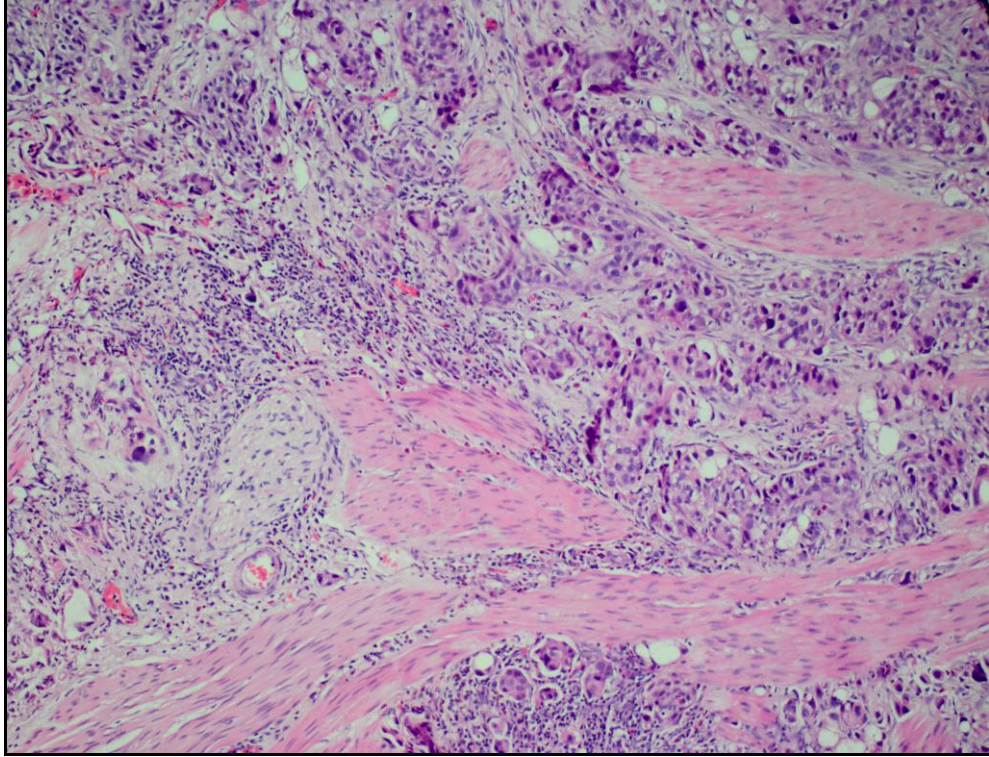


**Resim 6.** DDPÜK, polarite kaybı, hücrelerde irileşme, nükleuslarda,hiperkromazi ve düzensizlik (HE,x200)



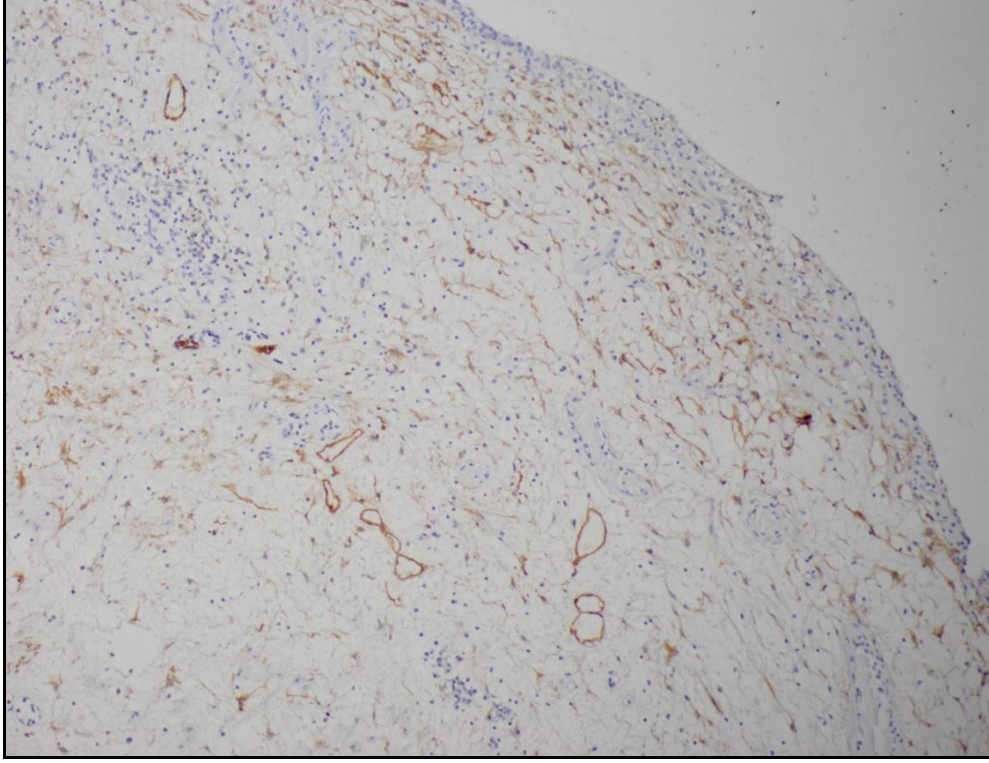


**Resim 7.** YDPÜK'de LP invazyonu ve belirgin sitolojik atipi (HE,x200)

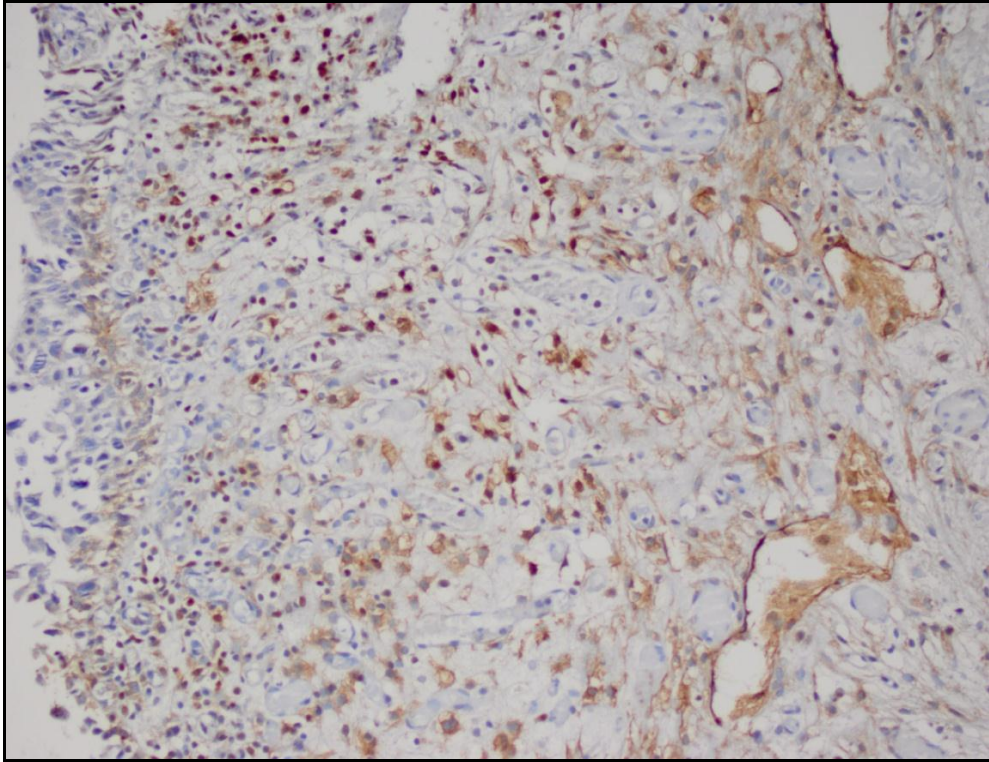


**Resim 8.** YDPÜK'de MP invazyonu (HE,x200)



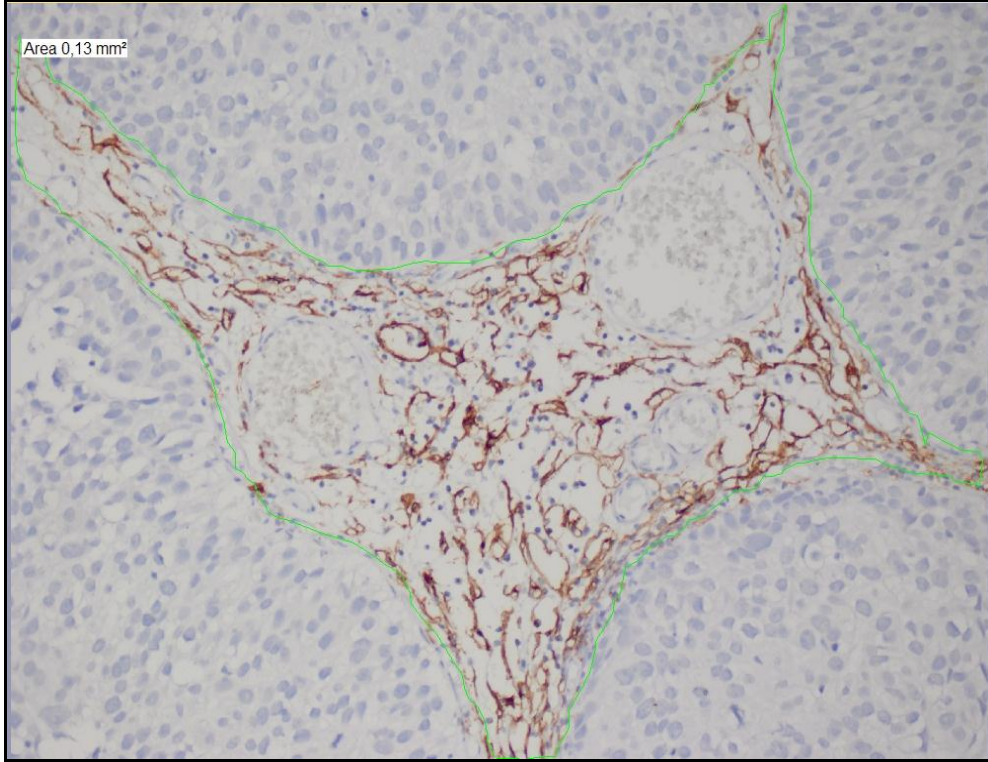


**Resim 9.** Olağan mukozada lenfatik damarların D2-40 ekspresyonu (HE,x100)

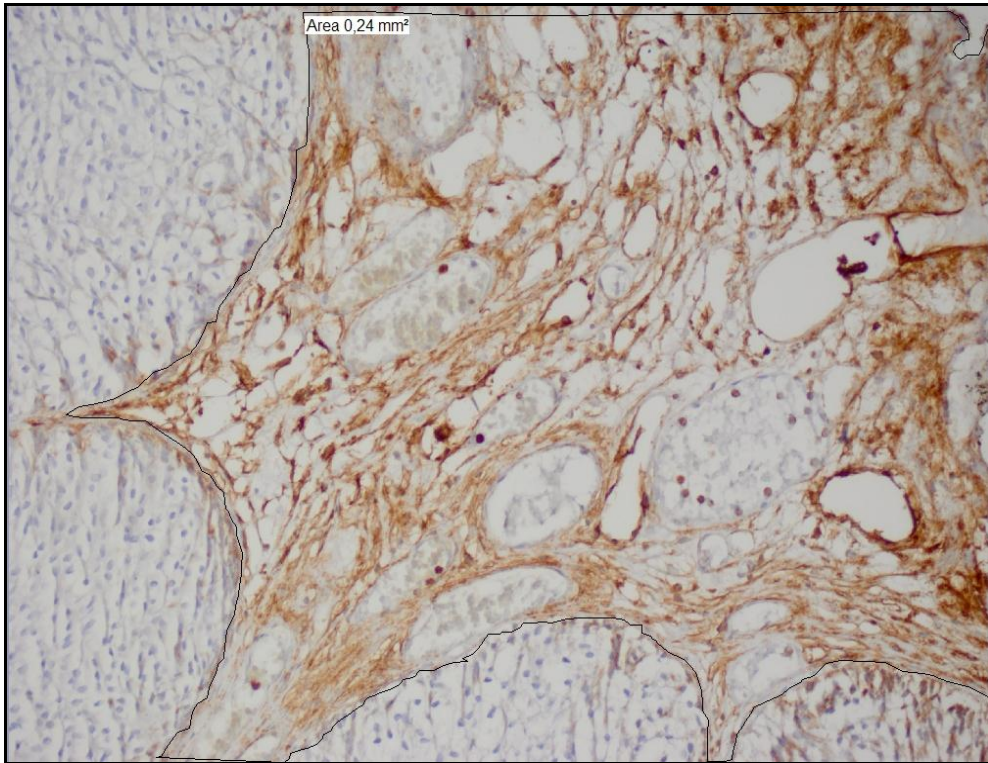


**Resim 10.** CIS'lı olgularda D2-40 pozitif lenfatik damarlar (HE,x 200)



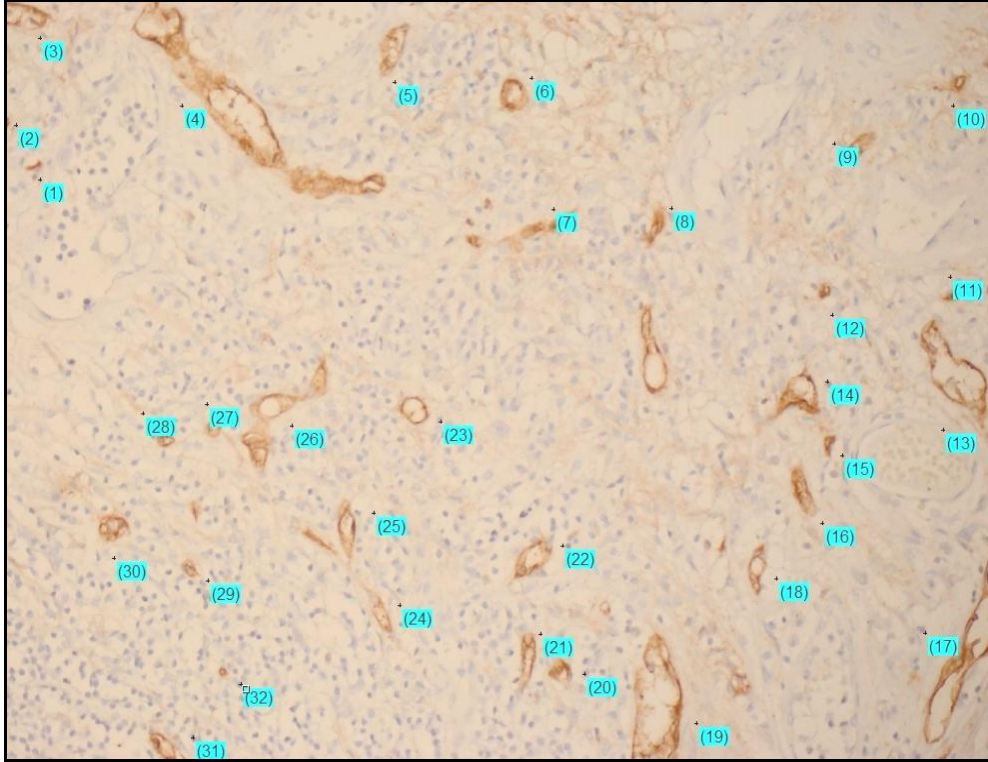


**Resim 11.** PÜN'ü olgularda stromal alanların ölçümü (HE,x200)

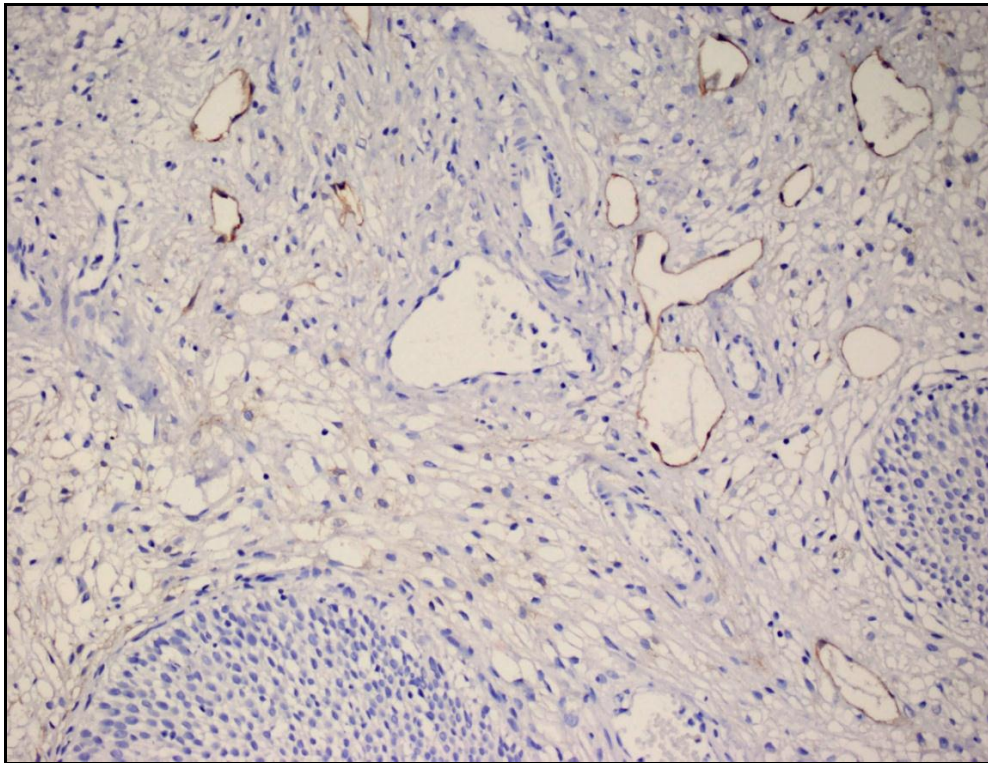


**Resim 12.** PÜN'ü olgularda stromal alanların ölçümü (HE,x200)

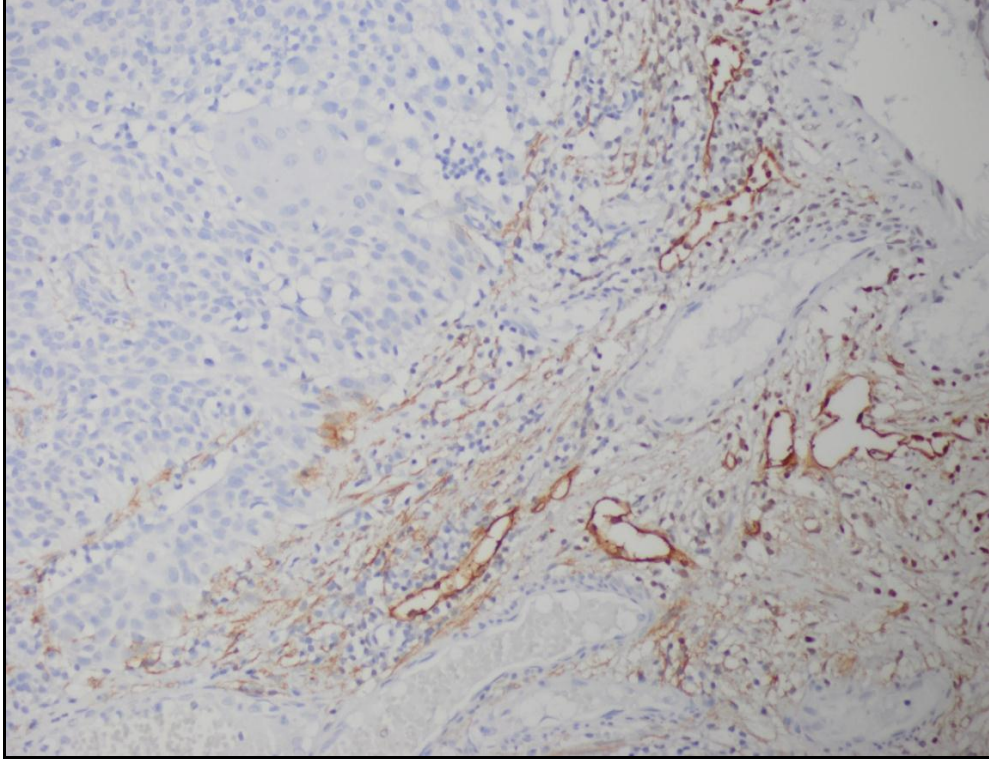




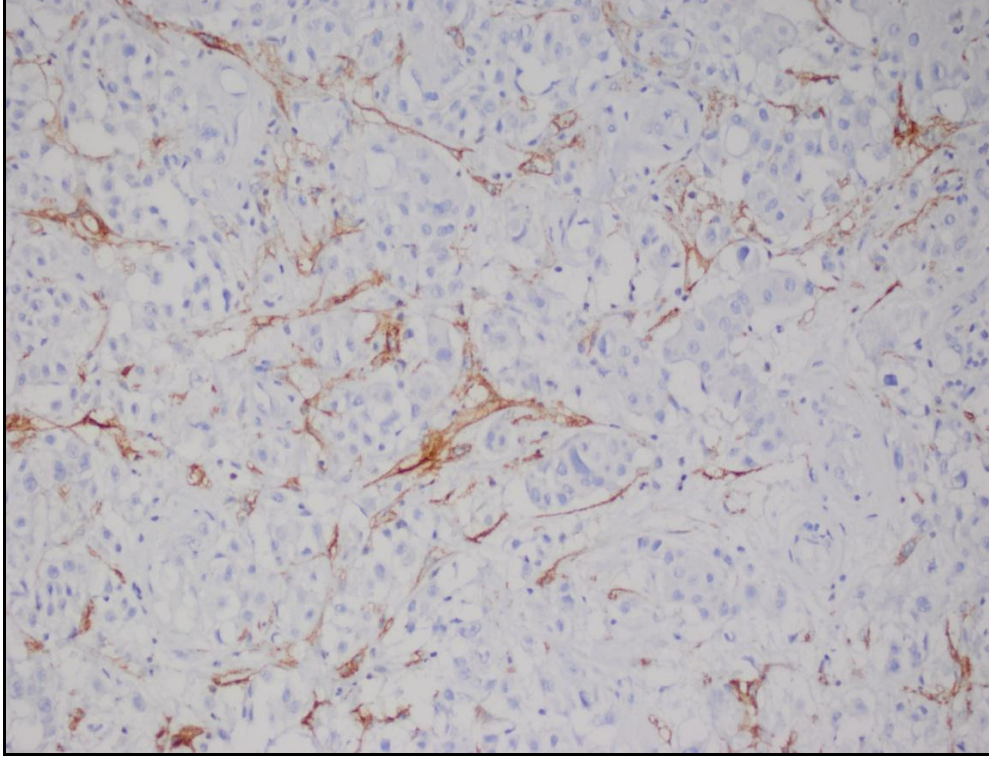
**Resim 13.** D2-40 pozitif lenfatik damarların sayımı (HE,x200)



**Resim 14.** DMPPÜN'li olgularda D2-40 pozitif lenfatik damarlar (HE,x200)

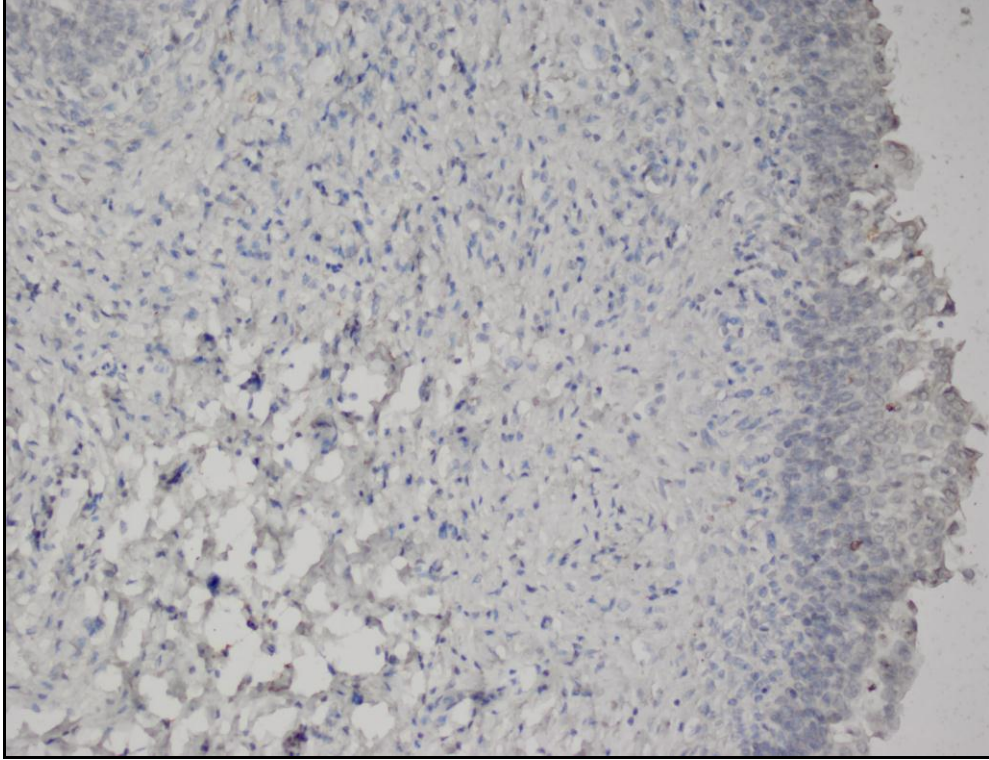


**Resim 15.** DDPÜK'li olgularda D2-40 pozitif lenfatik damarlar (HE,x200)

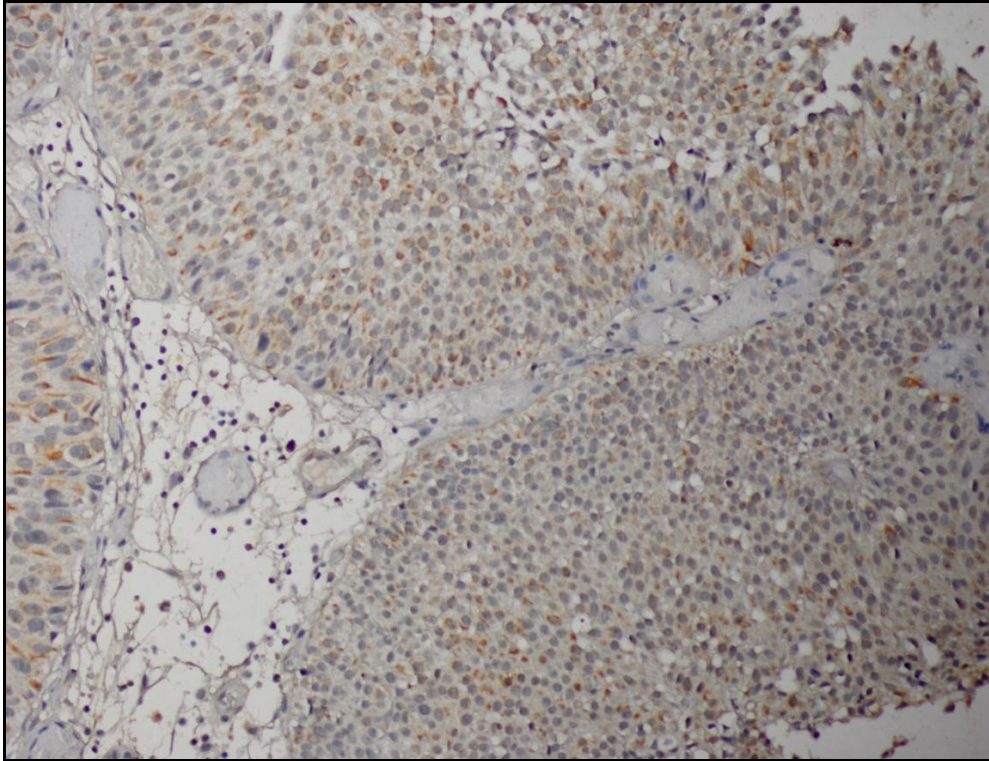


**Resim 16.** YDPÜK'li olgularda D2-40 pozitif lenfatik damarlar (HE,x200)



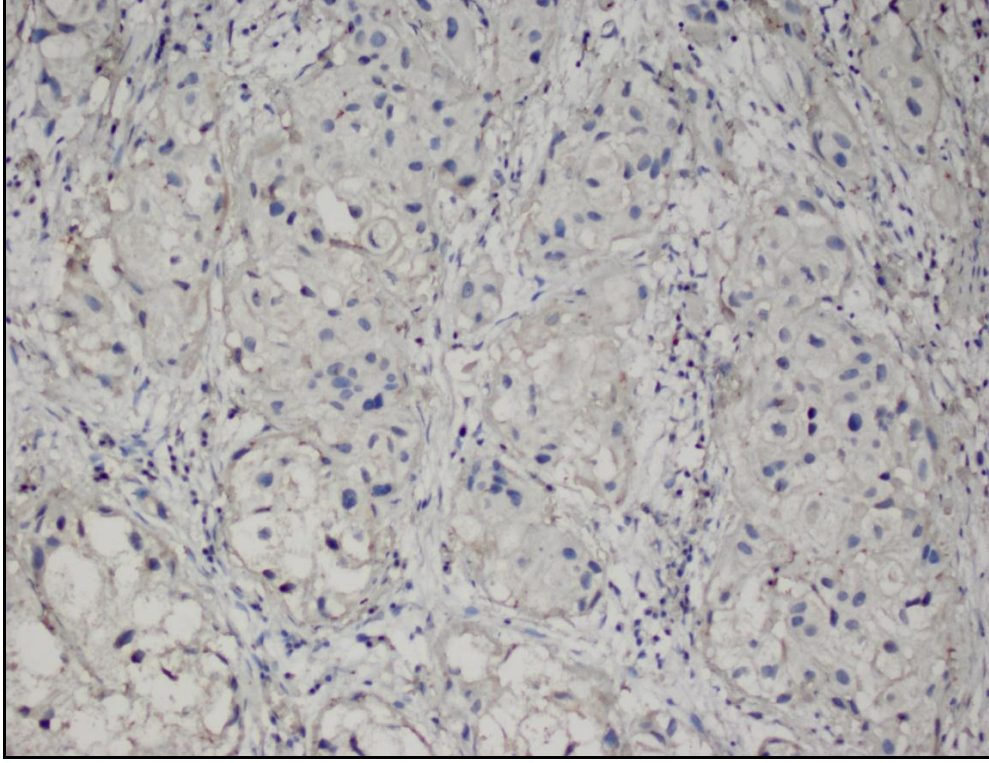


**Resim 17.** Normal mukoza negatif VEGF-C boyanması (HEx200)

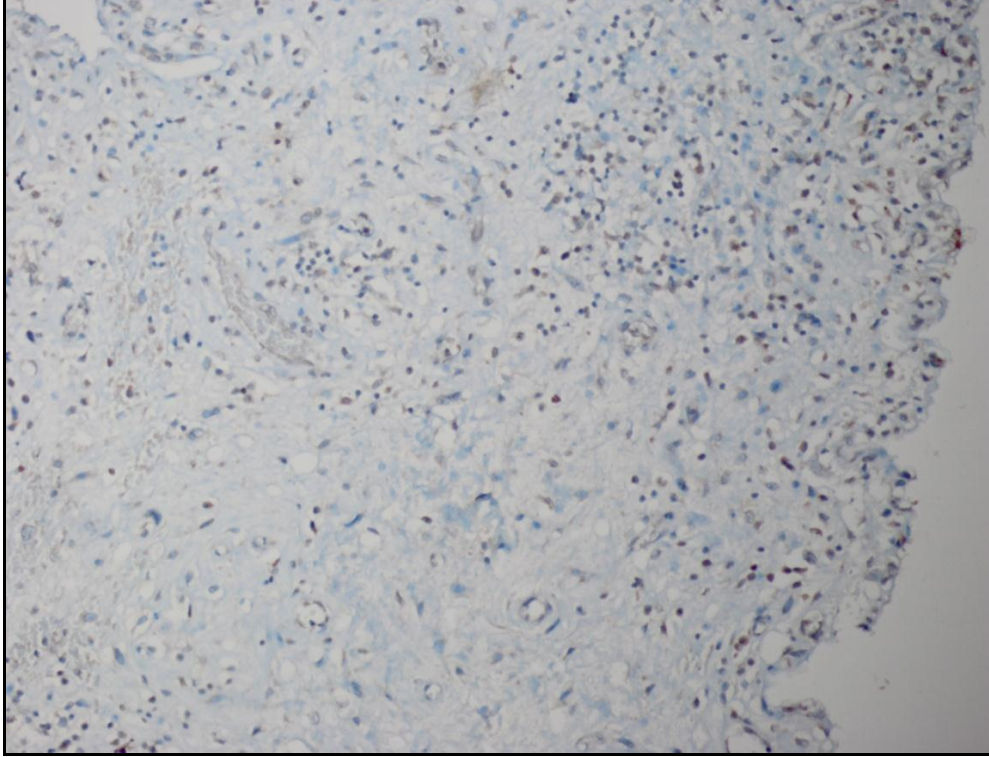


**Resim 18.** DDPÜK' de pozitif VEGF-C boyanması (HEx200)



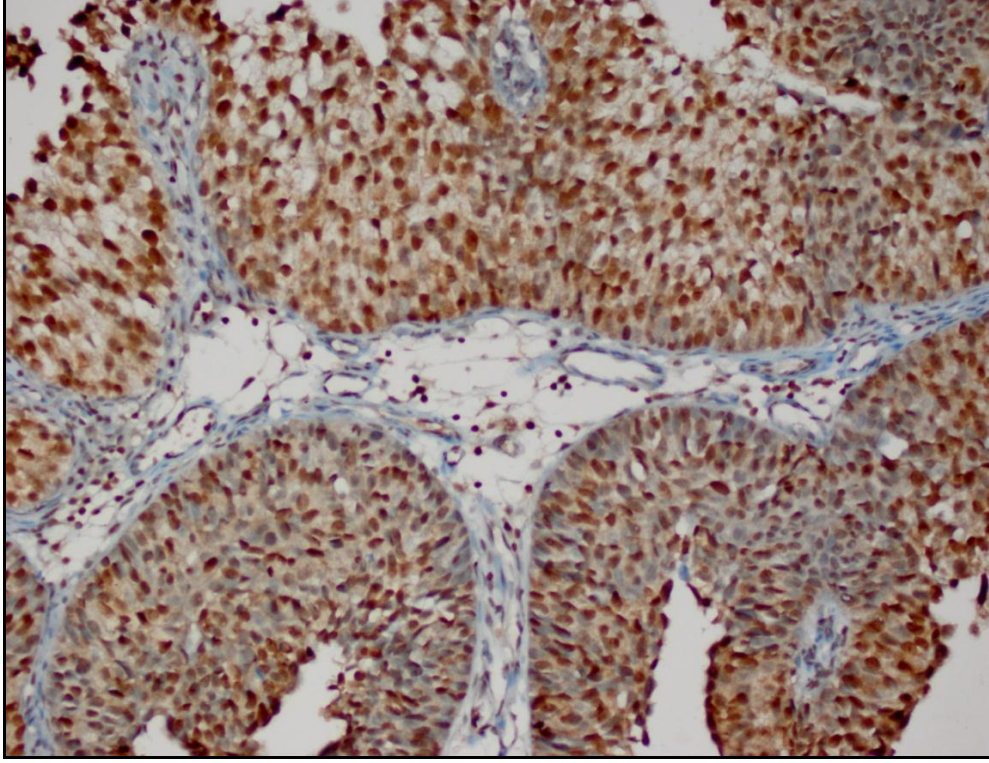


**Resim 19.** YDPÜK'de negatif VEGF-C boyanması (x200)

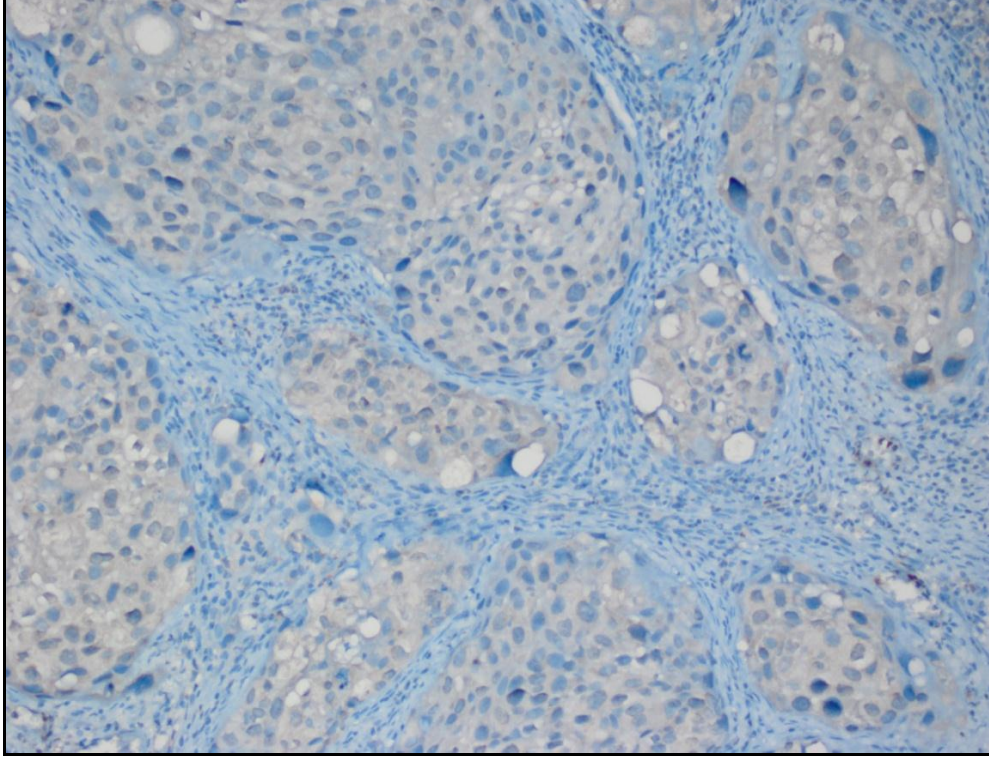


**Resim 20.** Olağan mukozada negatif VEGF-D boyanması (HEx200)





**Resim 21.** DDPÜK'de VEGF-D pozitifliği (x200)



**Resim 22.** YDPÜK'de VEGF-D negatifliği (x200)

## TARTIŞMA

Mesane kanserleri tüm dünyada yedinci en sık görülen kanserdir ve ürogenital bölgenin ikinci en sık malign tümörüdür (6,88). Mesane kanserlerinin de %90'dan fazlası ÜK'lerdir (6). ÜK'lerin erkek/kadın oranı 3.5/1'dir (6). Bizim olgu serimizde PÜN'lü olgularda erkek hastalar olguların %91,85'ini, kadın hastalar olguların %8,15'ini oluşturmakta olup erkek/kadın oranı 11/1 olarak değerlendirildi.

Mesane ÜK'lerinde olguların çoğunluğu 50 yaşın üstündedir (6). Bizim olgu serimizde de yaş ortalaması  $65\pm 0,90$  olarak saptandı.

Mesane ÜK'leri klinik olarak tanındığında %70-80 oranında non-invaziv ya da erken invaziv (Ta, Tis veya T1) evrededir ve genellikle TUR ile tedavi edilirler (6,88). Çalışmamızda non invaziv tümörler olguların % 39,6'ini, erken invaziv ya da LP invaziv tümörler olguların %39,1'ini oluşturuyordu. Yüzeysel papiller mesane tümörü oranımız toplam %78,7 olarak değerlendirildi. Yüzeysel tümörler TUR ile başlangıç tedaviden sonra rekürrens gösterebilir ve MP'ı invaze edebilirler (84). DMPPÜN'lerin rekürrens oranı %25-47 olarak verilmiş olup derece ya da evre progresyonu izlenmemiştir (59). Pan ve arkadaşlarının 1515 olgudan oluşan geniş bir seride yaptıkları çalışmada histolojik derece, invazyon, metastaz ve tümörden dolayı ölüm progresyon olarak sayılmıştır (62). Bu çalışmaya göre DMPPÜN'lerin nüks oranı %17,9 olarak verilmiş olup %1,9'unda derece ya da evre progresyonu izlenmiştir (62). Çalışmamızda 8 DMPPÜN olgusunun 2'si nüks göstermişti. Bu oran %25 olarak değerlendirilmiştir. Non-invaziv DDPÜK olgularının %48-71'i nüks etmektedir. DDPÜK'li olgularda evre progresyonu %5'den azdır (59).

Çalışmamızda izlemlı ve nükslü, non-invaziv DDPÜK'li olguların %42,8'i nüks etmiş olup literatür ile uyumludur. Pan ve ark. çalışmasında DDPÜK'li olguların %35.0'ı nüks göstermiştir. Çalışmamızda izlemi bulunan DDPÜK'li olguların %51,61'i nüks etmiştir. Pan ve arkadaşlarının çalışmasında, DDPÜK'li olguların progresyon gösterme oranı %6,5'dir (62). Çalışmamızda izlemi bulunan ve nüks eden DDPÜK'li olguların %31,25'i derece progresyonu göstermiştir. Non-invaziv yüksek dereceli tümörlerin %15-40'ı nüksünde evre progresyonu göstermektedir (59). Çalışmamızda bulunan 5 non invaziv YDPÜK olgusunun 1'inin nüksünde LP invazyonu gözlenmiştir. Pan ve ark.'nın çalışmasında YDPÜK'li olguların nüks gösterme oranı %34.0 olarak verilmiştir (62). Çalışmamızda izlemi bulunan YDPÜK'li olguların %70,58'i nüks göstermiştir. Pan ve arkadaşlarının çalışmasında YDPÜK'lerin progresyon gösterme oranı %28.8 olarak verilmiştir (62).

Pan ve ark.'nın çalışmasında non invaziv tümörlerin %8.0'nın, LP invaziv tümörlerin %26,9'unun progresyon gösterdiği bildirilmiştir (62). Bizim çalışmamızda, non invaziv tümörlerin progresyon gösterme oranı %31,81, LP invaziv olguların progresyon gösterme oranı %30,55 olarak değerlendirildi.

Yüzeyel tümörlerin nüks gösterebilmesi, metastaz ve azalmış sağkalım ile ilişkilidir (129-130). Bu yüzden bu tümörlerin nüksünün önceden öngörülebilmesi tümörün prognozu belirleyecektir.

Mesane tümörlerinde tümörün büyümesi, nüksü, progresyonu ve sağkalım ile ilişkili çeşitli büyüme faktörleri ve moleküller bildirilmiştir (119,120). Bu faktörlere göre, mikrodamar yoğunluğu mesane kanserleri için önemli prognostik belirleyici haline gelmiştir (131-133). Ancak lenfanjiogenezisin ve LDY'nin mesane kanserindeki klinik ve patolojik önemi henüz net değildir. Son yıllarda diğer bütün organlarda olduğu gibi mesanede de lenfanjiogenezis üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Kutanöz melanomlar, baş boyun skuamöz hücreli karsinomları, alt üriner trakt transisyonel hücreli tümörlerde, tiroid, kolorektal, böbrek, meme, pankreas, gastrik karsinomlarda intratümöral alanlarda; gastrik karsinomlar, akciğer, baş boyun skuamöz hücreli karsinomları (BBSHK), serviks, prostat, böbrek ve kolorektal karsinomlarda ise peritümöral alanlarda artmış LDY'nin lenf nodu tutulumu,

kötü prognoz, progresyon ve rekürrens ile ilişkili olduğunu kanıtlayan çalışmalar vardır (72-79, 74, 80-83). Ayrıca over, meme ve serviks karsinomlarında intratümöral lenfatiklerin prognoz ile ilişkili olmadığı yönünde de bulgular vardır (123,125). Mikrolenfanjiografi ve interstisyel sıvı basıncı gibi yöntemler kullanılarak yapılan bir çalışmada intratümöral lenfatiklerin non-fonksiyonel olduğu iddia edilmiştir ve bunun nedeninin tümör lenfatiklerinin primitif ve immatür olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür (122).

Lenf nodu metastazı geleneksel olarak kanser malignite potansiyelinde, uzak bölgelere yayılım ve rekürrensin anlaşılmasında kullanılan bir prognostik belirteçtir. Bu yüzden lenfatik damarlar günümüzde primer tümörün yayılımını engellemek üzere antimetastatik yaklaşımda hedef haline gelmiştir. Bölgesel lenf nodu tutulumu mesane ÜK'lerinde sistemik yayılımın erken bir bulgusudur ve genellikle kötü prognoz ile ilişkilidir (134). Tümörlerde lenfanjiogenezis kompleks mekanizmalarla oluşmaktadır. Tümör hücreleri ve/veya tümör ilişkili makrofajlar tarafından salınan VEGF-C ve VEGF-D lenfatiklere özgü VEGFR-3 reseptörüne bağlanarak lenfanjiogenezisi indüklemektedir (41,42). Artmış lenfanjiogenezisin tümör hücrelerinin lenf noduna ve uzak organlara metastazını sağladığı, çeşitli hayvan modelleri yanı sıra insan tümörlerinde de gösterilmiştir (134, 135). Mesane üzerinde yapılan bazı deneysel ve klinik çalışmalarda tümörün, peritümöral ve intratümöral lenfatikleri indüklediği ve bunun da lenfatik metastaz ile korele olduğu gösterilmiştir (85,121). Ma ve arkadaşları mesane ÜK'lerinde VEGF-D ekspresyonunun, LDY'nin, intratümöral lenfatiklerin varlığının ve lenfatik invazyonun lenf nodu metastazı kadar prognostik öneme sahip olduğunu saptamışlar ve postoperatif tedavi ve yaklaşım açısından faydalı olabileceğini savunmuşlardır. Ancak LDY ve VEGF-D ekspresyonunun mesane ÜK'lerinde bağımsız bir faktör olmadığı bulunmuştur (86). Miyata ve arkadaşlarının mesane kanserlerinde yaptıkları bir çalışmada ise LDY tümör derecesi ile ilişkili bulunmuş ancak tümör evresi (pT) ile ilişki saptanamamıştır (88). Baş boyun kanserlerinde, kutanöz melanomlarda yapılan bazı çalışmalarda ise LDY'nin invazyon ile ilişkili olmadığı saptanmıştır (136-138). Fernandez ve

arkadaşlarının kas invaziv mesane ÜK'lerinde yaptığı çalışmada, artmış intratümöral LDY kötü histolojik diferansiyasyon ile ( $p=0.001$ ), yüksek peritümöral LDY ise lenf nodu metastazı ile ilişkili bulunmuştur ( $p=0,0004$ ) (85).

Tümörlerde lenfatik damar sayımının, literatürde Weidner ve ark.'nın 1991'de tanımladığı yöntemle göre yapılabileceği bildirilmiştir (142,143). Bu yöntemle göre lenfatik damar yoğunluğunun en fazla olduğu "hot spot" alanlar x40'luk objektifte belirlenir. Bu aktif alanlarda lenfatik damar sayımı çeşitli bilgisayar programları veya grid kullanılarak değerlendirilebilmektedir. Literatürde mesane kanserlerinde LDY sistektomi materyallerinde intratümöral ve peritümöral alanlar dikkate alınarak değerlendirilmiştir (85,86,119). Yüzeysel mesane tümörlerinde mikrodamar yoğunluğunun değerlendirilmesi için yapılan bir çalışmada, TUR materyalinde lamina propria alanı dikkate alınmıştır (84). Mesane TUR materyalinde LDY değerlendirilmesinde de lamina propria alanları seçilmiştir (88). Çalışmamızda tümör örnekleri tamamen TUR materyallerine ait olup, tümöre komşu yalnızca lamina propria alanlarında bulunan LDY değerlendirildi. Mesanede yapılan çalışmalarda seçilen alanlar için x200'lük objektife giren alan ölçülmüştür. Bu alan içerisinde tümör girebileceğinden ve mesane TUR materyallerinde stromal alan çok az olabileceğinden çalışmamızda bir standart sağlamak üzere, tümöre komşu lamina propria alanları çizilerek ölçüm yapıldı.

Bizim çalışmamızda, LDY arttıkça histolojik derece ( $p=0,000$ ) ve invazyon derecesinin arttığı saptandı ( $p=0,001$ ). Ancak LDY ile nüks ve progresyon arasında bir ilişki saptanmadı. Normal mukozal alanlarında saptanan LDY neoplastik alanlarda saptanan LDY'den daha az olarak saptandı ( $p=0.000$ ). CİS'li olgularda saptanan LDY, düşük dereceli PÜN'lerde ( $p=0,006$ ) ve YDPÜK'li olgularda saptanan LDY'den daha az olarak saptandı ( $p=0,000$ ).

Meme ve prostat kanserinde VEGF-C ile lenf nodu metastazı arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Aynı şekilde over kanseri, oral kavite epidermoid karsinomu, kolorektal kanserler, mide kanseri, özefagus

kanserinde, akciğer ve melanomlarda de aynı bulgular elde edilmiştir. Deneysel modellerde, VEGF-C'nin pankreatik islet hücre tümörlü transgenik farelerde lenfanjiogenesis ve lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bir başka çalışmada VEGF-C ve COX-2 üreten gastrik tümör dokularının daha yüksek lenfatik invazyon ve metastatik potansiyele sahip olduğu gözlenmiştir (101-108,139).

Mesane kanserlerinde VEGF-C ekspresyonunu ilk kez Suzuki ve arkadaşları 87 sistektomi materyali ile yaptıkları çalışmada, pelvik lenf nodu metastazı ile ilişkili bulmuştur (109). Miyata ve arkadaşları yüzeysel mesane kanserlerinde, VEGF-C ile lenfanjiogenesisin düzenlendiğini ve buna bağlı olarak artan LDY'nin metastazsız sağkalım ile ilişkili olduğunu bulmuştur (88). Mylona ve ark. mesane ÜK'lerinde VEGF-C ekspresyonunun tümör evresi ile ters orantılı olduğunu ve daha iyi prognozu gösterdiğini bulmuşlardır (111). Zu ve arkadaşları mesane tümörlerinde VEGF-C ekspresyonu ile kötü prognoz ve lenf nodu metastazı oluşumu arasında ilişki saptamışlardır (110). Herrmann ve arkadaşları mesane kanserleri üzerinde yaptıkları çalışmada VEGF-C ekspresyonunun klinik gidiş ile bir ilişkisi olmadığını saptamışlardır (119). Sonuç olarak mesane kanserlerinde yapılan çeşitli çalışmalarda VEGF-C ile düzenlenen lenfanjiogenesisin ve tümörlerden aşırı VEGF-C ekspresyonunun çoğunlukla yüksek histolojik ve invazyon derecesi ile orantılı olup kötü prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuş olmasına rağmen aksi yayınlarda bulunmaktadır.

Bizim çalışmamızda olağan mukoza örneklerinin yalnızca 3'ünde VEGF-C ekspresyonu görüldü. Tümör hücreleri tarafından salınan VEGF-C ekspresyonu arttıkça mesane ÜK'lerinde histolojik derece ( $p=0,026$ ) ve invazyon derecesi azalıyordu ( $p=0,034$ ). Nükslü ve nüksüz olgular arasında VEGF-C ekspresyonu açısından farklılık bulunmakla birlikte bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0,056$ ).

Çeşitli araştırmacılar insan kanserlerinde VEGF-D'nin lenfanjiogenesis ve lenf nodu metastazı için bir başlatıcı olduğunu iddia etmişlerdir (88). Over kanseri ve BBSHC'larında, kolorektal karsinomlarda ve meme kanserinde lenfatik yayılım ile VEGF-D varlığı açısından ilişki bulunamamıştır (126,127).

VEGF-D kolorektal kanserlerde lenfatik tutulumla birlikte kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (140). Diğer taraftan VEGF-D ve VEGFR-3, gastrik adenokarsinomlar için bağımsız prognostik bir belirleyici olması yanı sıra bu tümör için lenfatik metastazla da ilişkili bulunmuştur (141). Bu çelişkili sonuçları açıklamak için bazı araştırmacılar VEGF-D'nin lenfanjiogenezis sürecinde proteolitik enzimlerden etkilendiğini ve inaktif bazı formların ortaya çıktığını öne sürmüşlerdir. Proteolitik formlar lenfatik yüzey epitelinde bulunan VEGF-D reseptörlerine, VEGF-D'nin bağlanma afinitesini değiştirmektedir (128). Miyata ve ark. mesane ÜK'lerinde VEGF-D'nin yalnızca LDY ile ilişkili olduğunu saptamıştır (88). Ma ve arkadaşları da mesane ÜK'de yüksek VEGF-D ekspresyonunun yüksek LDY ile ilişkili olduğunu göstermiştir (86). Gontero ve Herrmann mesane ÜK'lerinde VEGF-D ekspresyonunun sağkalım ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir (119,120). Herrmann'ın çalışmasında VEGF-D aşırı ekspresyonu olan olgularda, yüksek patolojik derece ( $p=0,021$ ) ve daha yüksek oranda lenf nodu metastazı ( $p=0,008$ ) bulunmuştur (119).

Bizim çalışmamızda, VEGF-D ekspresyonunun, LDY, yaş, cinsiyet, histolojik derece, invazyon derecesi, nüks ve progresyon gibi parametreler ile ilişkisi saptanmadı. Normal mukoza örneklerinin 10'unda pozitif boyanma görüldü. Literatürde mesane normal epitelinin VEGF-D ile boyanma göstermediği bildirilmiştir (118). Çalışmamızda normal mukoza ile neoplastik epitel VEGF-D ekspresyonu açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.



## SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada 12 DMPPÜN, 84 DDPÜK ve 88 YDPÜK olgusu ile 8 CİS odağı ve 30 normal mukoza örneği histopatolojik ölçütler yanı sıra D2-40, VEGF-C ve VEGF-D ekspresyonu açısından incelenmiştir.

PÜN olgularının yaşı arttıkça tümörün histolojik derecesi ( $p<0,001$ ) ve invazyon derecesi ( $pT$ ) artmaktadır ( $p=0,01$ ).

İzlemi bulunan 122 olgunun 71'i (%58,19) nüks göstermiştir. CIS tanısı alan 1 hasta, DMPPÜN tanısı alan 2 hasta (%1,64), DDPÜK tanısı alan 32 hasta (%26,23), YDPÜK tanısı alan 36 hasta (%29,50) nüks etmiştir. Nükslü ve nüksüz gruplar arasında histolojik derece ( $P=0,006$ ) ve invazyon derecesi açısından anlamlı fark bulunmuştur ( $p=0.000$ ). Nükslü grupta, nüksüz gruba göre histolojik derece ve invazyon daha yüksek olarak saptanmıştır. Nüks gösteren toplam 71 olgunun 11'i histolojik derece progresyonu, 18'i invazyon açısından progresyon göstermiştir.

Sistektomi materyalinden örneklenen 30 adet normal mukoza örneğinin LDY'si ortalama  $17,60\pm 7,07$  olarak değerlendirilmiştir. LDY'si en fazla olan olağan mukoza örneği trigon olarak değerlendirilmiştir. Tümör komşuluğundaki reaktif fibroblastlar ve myofibroblastlar D2-40 ekspresyonu gösteriyordu. Kan damarı endotelinde D2-40 pozitifliği görülmemiştir. DMPPÜN'li olguların ortalama LDY'si  $71,10\pm 74,89$ , DDPÜK'li olguların ortalama LDY'si  $59,63\pm 72,49$ , YDPÜK'li olguların ortalama LDY'si  $80,87\pm 113,75$  olarak değerlendirilmiştir. Normal mukoza ve neoplastik oluşumlarda bulunan LDY karşılaştırıldığında, normal mukozada LDY daha düşük saptanmıştır ( $p=0,003$ ).

PÜN'lü olgularda LDY ile histolojik derece arasında ( $p=0.000$ ) ve LDY ile invazyon derecesi arasında ( $p=0.001$ ) istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır. Histolojik derece ve invazyon derecesi arttıkça LDY artıyordu.

Ancak nükslü grupta LDY ortalaması daha yüksek olmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Histolojik derece ve invazyon progresyonu gösteren ve göstermeyen olgular arasında LDY açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Çalışmamızda LDY histolojik derece ve invazyon ile ilişkili olmakla birlikte tek başına nüksü öngörmede değerli bulunmamıştır. Artmış LDY'nin mesane ÜK'lerinde prognostik belirleyicilerden olan histolojik derece ve invazyon derecesi ile ilişkili bulunması, kötü prognoz ile LDY'nin ilişkili olduğunu düşündürmüştür.

VEGF-C ekspresyonu, tümör hücrelerinde çoğunlukla sitoplazmik bazen nükleer olarak saptanmıştır. Normal mukoza örneklerinin 27'sinde VEGF-C ekspresyonu görülmemiştir. PÜN'lü olgularda VEGF-C ekspresyonu arttıkça histolojik derece ( $p=0,026$ ) ve invazyon derecesi ( $p=0,034$ ) azalıyordu. Nükslü olgularda VEGF-C ekspresyonu nüksüz olgulara göre daha düşük saptanmıştır ancak bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0,056$ ).

Çalışmamızda VEGF-C ekspresyonu arttıkça histolojik derece ve invazyon derecesinin azalması olgularda daha iyi prognozu göstermektedir. Bu bulgu VEGF-C'nin anti apoptotik fenotipi ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür. Hasta sağkalımı açısından VEGF-C ekspresyonunun mesane ÜK'lerinde açıklığa kavuşturulması gerekmektedir.

VEGF-D ekspresyonu, tümör hücrelerinde çoğunlukla sitoplazmik bazen nükleer olarak saptanmıştır. PÜN'lerde histolojik derece, invazyon derecesi, nüks, progresyon (histolojik derece ve invazyon derecesi) ile VEGF-D ekspresyonu arasında ilişki saptanmamıştır. Çalışmamızda VEGF-D ekspresyonu klinikopatolojik parametrelerden hiçbiri ile ilişkili bulunmamıştır. Bu da VEGF-D'nin lenfanjiogenezis sürecinde proteolitik enzimlerden etkilendiğini ve inaktif bazı formların ortaya çıktığını düşündürmektedir. Proteolitik formlar lenfatik yüzey epitelinde bulunan VEGF-D reseptörlerine VEGF-D'nin bağlanma afinitesini değiştirmektedir.

Çalışmamızda mesane TUR materyallerinde, ÜK tanılı hastalarda saptanan LDY ile VEGF-C ve VEGF-D ekspresyonu arasında ilişki bulunamamıştır.

Çalışmamızda lenfanjiogenezisin düzenleyicilerinden olduğu bilinen VEGF-C ve VEGF-D ekspresyonu ile LDY arasında bir ilişki saptanmamıştır. Bu da tümör tarafından eksprese edilen büyüme faktörlerinin lenfatiklerde bulunan reseptörlere duyarlı olmayan etkisiz formlarda olduğunu düşündürmüştür.

Sonuç olarak bu çalışma ile mesane ÜK'lerinde, lenfanjiogenezisin inhibe edilmesiyle, histolojik derece ve invazyon derecesini azaltarak prognozu iyileştirebileceği düşünülmüştür. Mesane ÜK'lerinde VEGF-C ve VEGF-D ekspresyonları için ise çelişkili literatürler bulunmasından dolayı daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

## ÖZET

Bu çalışmada mesanenin 12 DMPPÜN, 84 DDPÜK ve 88 YDPÜK olgusu ile 8 CİS odağı ve 30 normal mukoza örneği yaş, cinsiyet, nüks, progresyon gibi klinik özellikler yanı sıra histopatolojik özellikler ile gözden geçirilmiştir.

D2-40, VEGF-C ve VEGF-D ekspresyonları tümör derecesi, tümör evresi, tümörün nüks ve progresyonundaki yararlılıkları açısından immunhistokimyasal yöntemle incelenmiştir.

PÜN'lü olguların yaşı tümörün histolojik derecesi ve invazyon derecesi (pT) ile pozitif korele bulunmakla birlikte (sırasıyla  $p < 0,001$ ,  $p = 0,01$ ), erkek ve kadın olgular arasında histolojik derece ve invazyon açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Nükslü grupta, nüksüz gruba göre histolojik derece ve invazyon daha yüksek saptanmıştır (sırasıyla  $p = 0,006$ ,  $p = 0,000$ ). Nüks gösteren toplam 34 olgunun 11'i histolojik derece progresyonu, 18'i invazyon açısından progresyon göstermiştir. Normal mukozada bulunan LDY, neoplastik oluşumlarda bulunan LDY'den daha düşük saptanmıştır ( $p = 0,003$ ). Tümörlü olgularda ise LDY, histolojik derece ve invazyon derecesi ile ilişkili olmakla birlikte nüksü öngörmede değerli bulunmamıştır. Artmış LDY'nin mesane ÜK'lerde prognostik belirleyicilerden olan histolojik derece ( $p = 0,000$ ) ve invazyon kapasitesi ile ( $p = 0,001$ ) ilişkili bulunması nedeniyle LDY'nin kötü prognoz ile ilişkili olduğu düşünülebilir. Çalışmamızda VEGF-C ekspresyonu arttıkça histolojik derece ( $p = 0,026$ ) ve invazyon derecesinin ( $p = 0,034$ ) azaldığı görülmektedir. VEGF-D ekspresyonu ise klinikopatolojik parametrelerden hiçbiri ile ilişkili bulunmamıştır. Literatürde mesane ÜK'lerinde VEGF-C ve VEGF-D için prognostik belirleyici olarak çelişkili sonuçların olması bu büyüme faktörlerinin geniş serilerde yeni antikolarla araştırılması gerektiğini düşündürmüştür.

## ABSTRACT

### **The Relationship of Lymphatic Vessel Density Detected by D2-40 and Expression of Lymphatic Endothelial Growth Factors (VEGF-C and VEGF-D) with Clinicopathological Parameters in Bladder Urothelial Neoplasms**

In this study, 12 PUNLMP, 84 LGPUC, 88 HGPUC, 8 CIS cases diagnosed in the bladder and 30 normal mucosal samples have been evaluated for the clinical features such as age, sex, recurrence and progression as well as histopathological features. The expressions of D2-40, VEGF-C, and VEGF-D have been immunohistochemically examined for the relations with grade and stage of the tumors and for to predict of recurrence and progression.

Although the age of patients with papillary urothelial neoplasms has been found positively correlated with grade and invasion (pT) ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,01$ , respectively), there was statistically no differences between male and females in terms of grade and invasion. It has been found that the grade and invasion degree were higher in patients showing recurrence than cases without recurrence ( $p = 0,006$ ,  $p = 0,000$ , respectively). In 71 cases with recurrence, histological progression has been found in 11 cases and progression of invasion degree in 18 cases.

LVD in normal mucosal samples has been found lower than those in neoplastic cases ( $p = 0,003$ ). In tumoral cases, LVD was found to be related with grade and invasion ( $p = 0,000$ ,  $p = 0,001$ , respectively); however, it was not worthy to predict of the recurrence. Because LVD was related with grade and invasion capacity of the tumors, it could be extracted that LVD is a negative prognostic factor. In addition, increasing VEGF-C expression has been found to be correlated with the decreasing grade and invasion capacity ( $p = 0,026$ ,  $p = 0,034$ , respectively). On the other hand, no relationship has

been found between VEGF-D expression and clinicopathological parameters. Since many studies about VEGF-C and VEGF-D expression in urothelial cancers of the bladder are contradicting each other, it is needed to study in large series and with new antibodies for these growth factors.

## KAYNAKLAR

1. Sadler T.W., Ürogenital sistem: Başaklar A. Can, ed. Langman's Medikal Embriyoloji. 7<sup>th</sup> ed. Williams C Wilkins: 1995. p. 269-271.
2. Reuter VE. Urinary bladder, Ureter, And Renal Pelvis. In: Sternberg SS, editor. Histology for Pathologists. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997. p. 835-47.
3. Reuter VE, Melamed MR. The Urotelial Tract: Renal Pelvis, Ureter, Urinary Bladder, and Urethra. In: Mills S. E., ed. Diagnostic Surgical Pathology. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams& Wilkins; 2010. p. 1837-1848.
4. Rosai J. Urinary Tract. In: Rosai J, editor. Ackerman's Surgical Pathology. 9<sup>th</sup> ed. Mosby, Inc.,2004. p.1317-1335.
5. Ebstein J.I., The Lower Urinary Tract and Male Genital System. In: Kumar V., Abbas A. K., Fausto N., Aster J.C ed. Robins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 8<sup>th</sup> ed, Philadelphia: Saunders, 2010:971-981.
6. Eble J, Sauter G, Epstein J, et al (Eds). Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System Male Genital Organs. Lyon, France. IARC Pres, 2004: 90-157.
7. Tekin A., Mesane Kanserlerinde Etiyoloji, Epidemiyoloji ve risk faktörleri. Özeri H., Türkeri L., ed. Üroonkoloji Kitabı. Ankara: Ertem Basın Yayın, 2007:151-153.
8. Auerbach O, Garfinkel L. Histologic changes in the urinary bladder in relation to cigarette smoking and use artificial sweeteners. Cancer 1989; 64: 983-87.

9. Çal C., Mesane Kanserlerinin Doğal Seyrinin Moleküler Mekanizmaları. Özeri H., Türkeri L., ed. Üroonkoloji Kitabı. Ankara: Ertem Basın Yayın, 2007:160-172.
10. Broders AC. Epithelioma of the genito-urinary organs. Ann Surg 1922; 75: 574.
11. Ash JE. Epitelial tumors of the bladder. J Urol 1940; 44: 135-45.
12. Franksson C. Tumours of the urinary bladder. Pathological and clinical study of 434 cases. Acta Chir Scand 1950; 100: 664.
13. Bergkvist A, Ljungqvist a, Moberger G. Classification of bladder tumours based on the cellular pattern. Preliminary report of a clinical-pathological study of 300 cases with a minimum follow-up of eight years. Acta Chir Scand 1965; 30: 371.
14. Mostofi FK, Sobin LH, Torloni H. Histological typing of urinary bladder tumours. International histological classification of tumours. World Health Organization 1973 Geneva; No: 10.
15. Koss LG. Tumors of the Urinary Bladder. Fascicle 11(2<sup>nd</sup> series). In: Atlas of Tumor Pathology. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1975: 16.
16. Malmström PU, Busch c, Norlen BJ. Recurrence, progression and survival in bladder cancer. A retrospective analysis of 232 patients with greare than or equal to 5-year follow-up. Scand J Urol Nephrol 1987; 21: 185.
17. Murphy WM, Beckwith JB, Farrow GM. Tumors of the Kidney, Bladder and Related Urinary Structures. In: Atlas of Tumor Pathology, Fascicle 13, 3<sup>rd</sup> series. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology,1994: 193-297.
18. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, et al. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology Consensus Classification of Urothelial (Transitional Cell) Neoplasms of the Urinary Bladder. Am J Surg Pathol 1998; 22: 1435-48.



19. Histological typing of urinary bladder tumours. International classification of tumours. World Health Organization 1999 Geneva; No: 10, 2<sup>nd</sup> ed.
20. Busch C, Albaga F. The WHO/ISUP 1998 and WHO 1999 systems for malignancy grading of bladder cancer. Scientific foundation and translation to on another and previous systems. *Virchows Arch* 2002; 441: 105-8.
21. Carbin BE, Ekman P, Gustafson h, et al. Grading of human urothelial carcinoma based on nuclear atypia and mitotic frequency. I. Histological description. *The Journal of Urology* 1991; 145: 968-71.
22. Aydın H. Özeri H., Mesane Kanserlerinin Patolojisi ve İdrar Sitolojisinin Ürotelyal Karsinom Tanısındaki Yeri. Özeri H., Türkeri L., ed. *Üroonkoloji Kitabı* .Ankara: Ertem Basın Yayın, 2007:p. 174-183.
23. Hammerich Kai Hans at all. Application of immunohistochemistry to the Genitourinary system. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132:432-440.
24. Reprinted with permission from AJCC: Urinary bladder. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 497–505.
25. NCCN Clinical Practice Guidelines Oncology, Bladder Cancer, V.I.2009.
26. Mc Kenney JK, Gomez JA, Desai S, et al. Morphologic expressions of urothelial carcinoma in situ: a detailed evaluation of its histological patterns with emphasis on carcinoma in situ with microinvasion. *Am J Surg. Pathol.* 2001;25:356-362.
27. Kausch I, Böhle A. Molecular aspects of bladder cancer III. Prognostic markers of bladder cancer. *Eur Urol* 2002; 41: 15-29.
28. Zlotta AR, Schulman CC. Biological markers in süperficial bladder tumors and their prognostic significance. *Urologic Clinics of North America* 2000; 27;1:179-89.
29. Bartaletti R, Cai T, Nesi G, et al. Qualitative and quantitative analysis of angiogenetic factors in transitional cell bladder carcinoma: Relationship

with clinical course at 10 years follow-up. *Oncol. Rep.* 2005;14;1:251-255.

30. Bachner BH, Cate RJ, Weidner N, et al. Angiogenesis in bladder cancer: Relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J. Natl Cancer Ins.* 1995;87:1603-1612.
31. Chaudinary R, Bromley m, Clarke N.W. et. al. Prognostic relevance of microvessel density in cancer of the urinary bladder. *Anticancer Res.* 1999;19:3479-3484.
32. Altuğ U. Mesane tümörlerinde tedavi. TÜYK Hazırlık Kursu Ders Notlar Kitabı, Ankara. 2006:196-208.
33. Oliver G, Detmar M. The rediscovery of the lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature. *Genes Dev* 2002;16:773-83.
34. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005; 438:946-53.
35. Michael S. Pepper. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: Myth or Reality? *Clinical cancer research*; March 2001;7:462-468.
36. McClure, C. F. W. The endothelial problem. *Anat. Rec.*, 1921;22: 219–237.
37. Wilting, J., Neeff, H., and Christ, B. Embryonic lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res.*, 1999;297: 1–11.
38. Alitalo K, Carmelie P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*; April 2002;1:219-227.
39. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci US A* 1995;92:3566- 70.
40. Stocker Steven A, Baldwin M. E., Achen M. G. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *Faseb J.* 2002;16: 922-934.
41. Jussila, L., Valtola R., Partanen T.A. et. al. Lymphatic endothelium and Kaposi's sarcoma spindle cells detected by antibodies against the vascular endothelial growth factor receptor-3. *Cancer Res.* 1998; 58, 1599–1604.

42. Kaipainen A., Korhonen, J., Mustonen, T. et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995;92: 3566–3570.
43. Akishima Y, Ito K, Zhang L, et al. Immunohistochemical detection at human small lymphatic vessels under normal and pathological conditions using the LYVE-1 antibody. *Virchows Arch.* 2004;444;153-157.
44. Kahn HJ, Bailey D, Marks A. Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium reacts with Kaposi sarcoma and a subset of angiosarcomas. *Mod. Pathol.* 2002;5;434-440.
45. Shimizu et al., Suppression of VEGFR-3 signaling inhibits lymph node metastasis in gastric cancer . *Cancer Sci.* 2004;95(4):328-33.
46. Von Marschall et al. VEGF-D induces lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in model of ductal pancreatic cancer. *Int J Oncol.* 2005 Sep;27(3):669-79.
47. Christian B., Mario I. Fernández, Lutz Trojan et al. Lymphangiogenesis occurs in upper tract urothelial carcinoma and correlates with lymphatic tumour dissemination and poor prognosis. *BJU International.* 2008;103;1040-1046.
48. Coşkun U., Akyürek N, Dursun A. Yamaç D. Peritumoral lymphatic microvessel density associated with tumor progression and poor prognosis in gastric carcinoma. *Journal of Surgical Research.* 2009; 1-6.
49. Franchi A, Gallo O, Massi D, et al. Tumor lymphangiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma: a morphometric study with clinical correlations. *Cancer* 2004;101:973–978.
50. Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, et al. Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol* 2003; 162:1951–1960.

51. Hashimoto I, Kodama J, Seki N, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression and its relationship to pelvic lymph node status in invasive cervical cancer. *Br J Cancer* 2001;85:93–97.
52. Rubbia-Brandt L, Terris B, Giostra E, et al. Lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression correlate with malignant behavior in human pancreatic endocrine tumors. *Clin Cancer Res* 2004;10:6919–6928.
53. Williams CSM, Leek RD, Robson AM, et al. Absence of lymphangiogenesis and intratumoral lymph vessels in human metastatic breast cancer. *J Pathol* 2003;200:195–206.
54. Roma AA, Magi-Galluzzi C, Kral MA, et al. Peritumoral lymphatic invasion is associated with regional lymph node metastasis in prostate adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2006;19:392–398.
55. Mori D., Yamasaki F., Shibaki M and Tokunaga O. Lateral peritumoral lymphatic vessel invasion can predict lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Modern Pathology* 2007;20:694-700.
56. Marks A, Sutherland DR, Bailey D et al. Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumors. *Br J Cancer* 1999;80:569–78.
57. Fukunaga M. Expression of D2-40 in lymphatic endothelium of normal tissues and in vascular tumors. *Histopathology* 2005;46:396.
58. Kahn HJ, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest* 2002;82:1255-1257.
59. Galluzzi C.M, Zhou M and Epstein J.I. Neoplasms of the Urinary Bladder. In:Zhou M. ed. *Genitourinary Pathology a Volume in the Series Foundations in Diagnostic Pathology*, 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia:Livingstone C, 2007:154-220.
60. Franchi A, Gallo O, Massi D, et al. Tumor lymphangiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma: a morphometric study with clinical correlations. *Cancer* 2004;101:973–978.

61. Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, et al. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* 2005;166:913–921.
62. Pan C.C, Chang Y.H., Chen K.K. et al. Prognostic Significance of the 2004 WHO/ISUP Classification for Prediction of Recurrence, Progression, and Cancer-Specific Mortality of Non–Muscle-Invasive Urothelial Tumors of the Urinary Bladder. A Clinicopathologic Study of 1,515 Cases. *Am J Clin Pathol* 2010;133:788-795.
63. Chang M., Vargas S., Hornick J., Hirsch M. et al. Embryonic stem cell transcription factors and D2-40 (podoplanin) as diagnostic immunohistochemical markers in ovarian germ cell tumors. *International Journal of Gynecological Pathology* 2009;28:347-355.
64. Roy S, Chu A., Trojanowski J. Q. et al. D2-40, a novel monoclonal antibody against the M2A antigen as a marker to distinguish hemangioblastomas from renal cell carcinomas. *Acta Neuropathol* 2005; 109: 497–502.
65. Xie Q, Chen L, Fu Ki. et al. Podoplanin (D2-40): A New Immunohistochemical Marker for Reactive Follicular Dendritic Cells and Follicular Dendritic Cell Sarcomas/ *Int J Clin Exp Pathol* 2008;1, 276-284.
66. Huse JT, Pahsa TL, Zhang PJ. D2-40 functions as an effective chondroid marker distinguishing true chondroid tumors from chordoma. *Açta Neuropathol* 2007;113:87-94.
67. Takei H, Bhattacharjee MB, Rivera A, et al. New Immunohistochemical Markers in the Evaluation of Central Nervous System Tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131:234-241.
68. Urabe A, Matsumoto T, Kimura M et al. Grading system of lymphatic invasion according to D2-40 immunostaining is useful for the prediction of nodal metastasis in squamous celi carcinoma of the uterine cervix. *Histopathology*. 2006;49:493-497.

69. Dumoff KL, Chu C, Xu X et al. Low D2-40 immunoreactivity correlates with lymphatic invasion and nodal metastasis in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Mod Pathol*. 2005;18:97-104.
70. Mimura T, Ito A, Sakuma T. et al. Novel Marker D2-40, Combined With Calretinin, CEA, and TTF-1. *Cancer*. 2007;109:933-998.
71. Emberger M., Laimer M., Steiner H. et al. Retiform hemangioendothelioma: presentation of a case expressing D2-40. *J. Cutan Pathol* 2009;36:987-990.
72. Saad RS, Kordunsky L, Liu YL, et al. Lymphatic microvessel density as prognostic marker in colorectal cancer. *Mod. Pathol* 2006;19:1317.
73. Miyata Y, Kanda S, Ohba K, et al. Tumor lymphangiogenesis in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract: Association with clinicopathological features and prognosis. *J Urol* 2006;176:348.
74. Kyzas PA, Geleff S., Batistatou A, et al. Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2005;206:170.
75. Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, et al. Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol* 2003;162:1951.
76. Hall FT, Freeman JL, Asa SL, et al. Intratumoral lymphatics and lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;129:716.
77. Horiguchi A, Ito K, Sumitomo M, et al. Intratumoral lymphatics and lymphatic invasion are associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in renal cell carcinoma. *Urology* 2008;71:928.
78. Bono P, Wasenius VM, Heikkila P, et al. High LYVE-1 positive lymphatic vessel numbers are associated with poor outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10:7144.
79. Kurahara H, Takao S, Maemura K, et al. Impact of vascular endothelial growth factor-C and -D expression in human pancreatic cancer: its relationship to lymph node metastasis. *Clin Cancer Res* 2004;10:8413.

80. Gombos Z, Xu X, Chu CS, et al. Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor expression in early stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res* 2005;11:8364.
81. Renyi-Vamos F, Tavori J, Flinger J, et al. Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11:7344.
82. Zeng Y, Opeskin K, Horvath LG, et al. Lymphatic vessel density and lymph node metastasis in prostate cancer. *Prostate* 2005;65:222.
83. Iwata T, Miyata Y, Kanda S, et al. Lymphangiogenesis and angiogenesis in conventional renal cell carcinoma: association with vascular endothelial growth factors A to D immunohistochemistry. *Urology* 2008;71:749.
84. Sağol Ö., Yörükoğlu K., Sıs B. et al. Does angiogenesis predict recurrence in superficial transitional cell carcinoma of bladder? *Urology*, 2001;57:895-898.
85. Fernandez MI, Bolenz C., Trojan et al. Prognostic implications of lymphangiogenesis in muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur. Urol.*2008;53;571-578.
86. Ma Y., Hou Y., Liu B. et al. Intratumoral Lymphatics and Lymphatic Vessel Invasion Detected by D2-40 Are Essential for Lymph Node Metastasis in Bladder Transitional Cell Carcinoma. *The Anatomical Record* 2010;293:1847–1854.
87. Saban MR, Towner R, Smith N et al. Lymphatic vessel density and function in experimental bladder cancer. *BMC Cancer* 2007;7;219.
88. Miyata Y, Kanda S, Ohba K, et al. 2006. Lymphangiogenesis and angiogenesis in bladder cancer; prognostic implications and regulation by vascular endothelial growth factors-A, -C, -D. *Clin. Cancer Res* 12:800-806.

89. Zachary I, Mathur A, Yla-Herttuala S, et al. Vascular protection: A novel nonangiogenic cardiovascular role for vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vase Biol.* 2000; 20: 1512-20.
90. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003; 9: 669–676.
91. Gerwins P, Sköldenberg E, Claesson-Welsh L. Function of fibroblast factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2000; 34: 185–194.
92. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR–3) and KDR (VEGFR–2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996; 15: 1751–1758.
93. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR–3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 1996; 122: 3829–3837.
94. Karkkainen MJ, Petrova TV. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene*, 2000; 19: 5598-5605.
95. Kubo H, Cao R, Brakenheilm E, Makinen T. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor-3 signaling inhibits fibroblast growth factor-2-induced lymphangiogenesis in mouse cornea. *PNAS*, 2002; 99 (13): 8868-8873.
96. Gunningham SP, Currie MJ, Han C. et al. The short form of the alternatively spliced flt-4 but not its ligand vascular endothelial growth factor C is related to lymph node metastasis in human breast cancers. *Clin Cancer Res*, 2000; 6: 4278-4286.
97. LI Q, Dong X, Gu W. et al. Clinical significance of coexpression of VEGF-C and VEGFR–3 in non small cell lung cancer. *Chin Med J* 2003; 116: 727–730.
98. Barbera-Guillem E, Nyhus JK, Wolford CC, et al. Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially



supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes potentiate the process. *Cancer Res*, 2002; 62: 7042-7049.

99. Valtola R, Salven P, Heikkila P, et al. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol*, 1999; 154: 1381-1390.
100. Matilla MMT, Ruohola JK, Karpanen T, et al. VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors. *Int J Cancer*, 2002; 98: 946-951.
101. Hoar FJ, Chaudhri S, Wadley MS, et al. Co-expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and c-erbB2 in human breast carcinoma. *Eur J Cancer*, 2003; 39;12:1698-1703.
102. Kajita T, Ohta Y, Kimura K, et al. The expression of vascular endothelial growth factor C and its receptors in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*, 2001; 85;2:255-260.
103. Kabashima A, Maehara Y, Kakeji Y, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor C is related to lymphogenous metastasis in early gastric carcinoma. *Oncology*, 2001; 60;2:146-150.
104. Kitadai Y, Amioka T, Haruma K, et al. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*, 2001; 93;5: 662-666.
105. Tsurusaki T, Kanda S, Sakai H, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Br. J Cancer* 1999; 80 (1-2): 309-313.
106. Crew JP. Vascular endothelial growth factor: an important angiogenic mediator in bladder cancer. *Eur Urol*, 1999; 35;1:2-8.
107. Furudo A, Tanaka S, Hamura K, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor C expression and angiogenesis at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma. *Oncology*, 2002; 62: 157-166.
108. Liu J, Yu HG, Yu JP, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 in gastric cancer correlates with the high abundance of vascular

- endothelial growth factor-C and lymphatic metastasis, *Med. Oncol.* 2005; 22:389–398.
109. Suzuki K, Morita T and Tokue A: Vascular endothelial growth factor-C expression predicts lymph node metastasis of transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Urol* 2005;12:152-158.
110. Zu X, Tang Z, Li Y, et al. Vascular endothelial growth factor C expression in bladder transitional cell cancer and relationship to lymph node metastasis. *BJU Int.*2006;98:1090-1093.
111. Mylona E, Magkou C, Gorantonakis G, et al. Evaluation of the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-C Role in Urothelial Carcinomas of the Bladder. *Anticancer Res* 2006;26:3567-3571.
112. Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, et al. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 2441–2449.
113. Shimizu K, Kubo H, Yamaguchi K, et al. Suppression of VEGFR-3 signaling inhibits lymph node metastasis in gastric cancer. *Cancer Sci* 2004;95:328–333.
114. Funaki H, Nishimura G, Harada S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor D is associated with lymph node metastasis in human colorectal carcinoma. *Oncology* 2003; 64:416–422.
115. Li L, Liu B, Li X, et al. Vascular endothelial growth factor D and intratumoral lymphatics as independent prognostic factors in epithelial ovarian carcinoma. *Anat Rec* 2009;292:562–569.
116. Yokoyama Y, Charnock-Jones DS, Licence D, et al. Vascular endothelial growth factor-D is an independent prognostic factor in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2003; 88:237–244.
117. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in breast carcinoma with long-term follow-up. *Clin Cancer Res* 2003;9:716–721.
118. Liu B, Ma J, Wang X, et al. Lymphangiogenesis and its relationship with lymphatic metastasis and prognosis in malignant melanoma. *Anat Rec* 2008;291:1227–1235.

119. Herrmann E, Eltze E, Bierer S, et al. VEGF-C, VEGF-D and Flt-4 in transitional bladder cancer: relationships to clinicopathological parameters and long-term survival. *Anticancer Res* 2007;27:3127–3133.
120. Gontero P, Banisadr S, Frea B, et al. Metastatic markers in bladder cancer: a review of the literature and clinical considerations. *Eur Urol* 2004;46:296–311.
121. Cao YH. Why and how do tumors stimulate lymphangiogenesis? *Lymphat Res Biol* 2008; 6:145–148.
122. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 2002; 296:1883–1886.
123. Birner P, Schindl M, Obermair A, et al. Lymphatic microvessel density in epithelial ovarian cancer: its impact on prognosis. *Anticancer Res* 2000;20:2981–2985
124. Williams CS, Leek RD, Robson AM, et al. Absence of lymphangiogenesis and intratumoural lymph vessels in human metastatic breast cancer. *J Pathol* 2003;200:195–206.
125. Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, et al. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 2002;161:947–956.
126. George ML, Tutton MG, Janssen F, et al. VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in colorectal cancer progression. *Neoplasia* 2001;3:420–427.
127. Mohammed RA, Green A, El-Shikh S, et al. Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors-A, -C and -D in breast cancer and their relationship with angio- and lymphangiogenesis. *Br J Cancer* 2007;96:1092–1100.
128. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*.1999;13:9–22.
129. Malkowicz SB. Intravesical therapy for superficial bladder cancer. *Semin Urol Oncol* 2000;4:280-8.

130. Kurth KH, Bouffieux C, Sylvester R, et al. Treatment of superficial bladder tumors: achievements and needs. The EORTC Genitourinary Group. *Eur Urol* 2000;37:1-9.
131. Dickinson AJ, Fox SB, Persad RA, et al. Quantification of angiogenesis as an independent predictor of progression in invasive bladder carcinomas. *Br J Urol* 1994;74:762-6.
132. 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;89:219-27.
133. Streeter EH, Harris AL. Angiogenesis in bladder cancer prognostic marker and target for further therapy. *Surg Oncol* 2002;11:85-100.
134. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, et al. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2002;2:573-583
135. Saharinen P., Tammela T., Karkkainen MJ et al, Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol* 2004;25:387-395.
136. Franchi A, Gallo O, Massi D, et al. Tumor lymphangiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. A morphometric study with clinical correlations. *Cancer* 2004;101:973-8.
137. Beasley NJ, Prevo R, Banerji S, et al. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res* 2002;62:1315-20.
138. Straume O, Jackson DG, Akslen LA. Independent prognostic impact of lymphatic vessel density and presence of low-grade lymphangiogenesis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:250-6.
139. Satacker SA, Williams RA and Achen MG., Lymphangiogenic growth factors as markers of tumor metastasis. *APMIS* 2004;112:539-549.
140. White JD, Hewett PW, Kosuge D, et al., Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. *Cancer Research* 2002;62:1669-1675.

141. Jüttner S., Wissmann C, Jöns T et al. Vascular endothelial growth factor-D and its receptor VEGFR-3: two novel independent prognostic markers in gastric adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2006 ;10;24(2):228-40.
142. Auwera I.V, Cao Y., Tille J.C., et al. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *British Journal of Cancer*. 2006;95:1611-1625.
143. Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Eng J. Med*. 1991;324:1-8.