

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**MESANENİN DEĞİŞİCİ EPİTEL KARSİNOMLARINDA
p53, Ki-67, bcl-2 ve p27^{Kip1} EKSPRESYONUNUN DERECELENDİRME
SİSTEMLERİYLE VE PROGNOZLA İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Olca BAŞTÜRK

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ali Rıza KANDİLOĞLU

Manisa, 2003
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**MESANENİN DEĞİŞİCİ EPİTEL KARSİNOMLARINDA
p53, Ki-67, bcl-2 ve p27^{Kip1} EKPREZYONUNUN DERECELENDİRME
SİSTEMLERİYLE VE PROGNOZLA
İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Olca BAŞTÜRK

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ali Rıza KANDİLOĞLU

Manisa, 2003

Patoloji eğitimim ve tez hazırlığım boyunca yalnızca bilimsel yol göstericiliğini değil, anlayış ve desteğini de hep yanımda hissettiğim hocam Prof. Dr. Ali Rıza Kandiloğlu'na; bilgi ve deneyimleri kadar, iyi niyetleriyle de bana daima yardımcı olan Doç. Dr. Aydın İşisağ'a; Yrd. Doç. Dr. Semin Ayhan'a, Yrd. Doç. Dr. Mehmet Akif Demir'e ve Yrd. Doç. Dr. Peyker Türkdoğan'a; birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakóltesi Patoloji Anabilim Dalı'ndaki Uzm. Dr. Nalân Neře ve asistan arkadaşlarıma; tezimin klinikle korelasyonunda yakın ilgisini gördüğüm Doç. Dr. Murat Lekili'ye ve özverili katkılarını her zaman anımsayacağım Dr. Çağrı Asan'a; teknik destekleri olmasa bu çalışmayı tamamlayamayacağım laboratuvar ve arşiv görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Sonsuz sevgi ve sabırlarıyla yaşamımın her anında benimle olan anneme, babama, kardeşime ve dostlarıma da ayrıca teşekkür ederim.

Dr. Olca BAŞTÜRK

KISALTMALAR

| | |
|--------------|--|
| BCG | : Calmette-Guerin bacillus |
| Cdk | : Siklin bağımlı kinaz |
| CIS | : Karsinoma in situ |
| DEK | : Değişici epitel karsinomu |
| DMPÜN | : Düşük malignite potansiyelli papiller ürotelial neoplazm |
| HE | : Hemotoksilen-eosin |
| Kd | : Kilodalton |
| LP | : Lamina propria |
| MMC | : Mitomycin C |
| MP | : Muskularis propria |
| TBS | : Tris buffered saline |
| TNM | : Tümör-Nod-Metastaz |
| TUR | : Transüretral rezeksiyon |

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|----|
| ÖNSÖZ | |
| I. GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| II. GENEL BİLGİLER | 2 |
| 1. Mesanenin Anatomisi ve Histolojisi | 2 |
| 2. Değişici Epitel Karsinomu | 4 |
| Genel Özellikler | 4 |
| Morfolojik Özellikler | 5 |
| Derecelendirme | 6 |
| İmmünohistokimya ve Diğer Özel Teknikler | 12 |
| Evrelendirme | 12 |
| Sağaltım | 14 |
| 3. İmmünohistokimyasal Belirleyiciler | 14 |
| p53 | 14 |
| Ki-67 | 17 |
| bcl-2 | 17 |
| p27 ^{Kip1} | 19 |
| 4. Prognoz | 20 |
| III. GEREÇ VE YÖNTEM | 22 |
| IV. BULGULAR | 25 |
| V. TARTIŞMA VE SONUÇLAR | 48 |
| VI. ÖZET | 57 |
| VII. İNGİLİZCE ÖZET | 59 |
| VIII. KAYNAKLAR | 61 |

GİRİŞ VE AMAÇ

Mesaneenin değişici epitel karsinomu (DEK) genitoüriner sistemin sık bir malignitesidir. Orta ve ileri yaşlı erkeklerde en sık görölen tümörler sıralamasında ikinci sırada bulunur. Sağaltım yaklaşımının belirlenmesinde biyolojik potansiyelinin doğru değerlendirilmesinin önemi büyüktür. Patolojik evre ve derece bu potansiyeli belirleyen temel prognostik faktörler olmakla birlikte aynı evre ve aynı derece tümörler arasında bile farklı davranış modellerinin bulunması ilişkili başka faktörlerin de bulunduğunu düşündürmekte ve yeni belirleyicilere gereksinim duyulmaktadır.

Bu amaçla yapılan araştırmalarda –kanser gelişiminin altında yatan hücresel mekanizmaların giderek daha fazla anlaşılmasının da etkisiyle– özellikle hücre proliferasyonunun düzenlenmesi ile ilgili moleküler belirleyiciler üzerinde durulmaktadır. Pekçok tümörde prognostik faktör olarak kabul edilen p53 ve p27 gibi süpresör genlerin inaktivasyonu ve Ki-67 gibi proliferasyon faktörleri ile bcl-2 gibi apoptozisi (programlanmış hücre ölümü) baskılayan genlerin aşırı ekspresyonu DEK’lerde de incelenmiş ancak sonuçlarla ilgili olarak henüz bir görüş birliğine varılamamıştır. Çalışmamızın amacı bu moleküler belirleyicileri kendi serimizde değerlendirmek ve bulgularımızı literatür ile karşılaştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

MESANENİN ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

Mesane, kloaka ve ürogenital sinustan gelişen; 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. Benzer biçimde erkeklerdeki mesane karsinomlarında paravezikal 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.

Mesanenin 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.

Mesanenin 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 (1,2).

Miksiyondan sorumlu vezikal sinir pleksusu T11-L2 sinirlerinden gelen sempatik ve S2-4 sinirlerinden gelen parasempatik dallardan oluşur. Mesane dolunca ağrıya yol açan duyuşal sinirler de pelvik ve hipogastrik sinirlerden gelir (1).

Mesane duvarında dört tabaka vardır: Epitel (değişici epitel/ürotelyum), lamina propria (LP), muskularis propria (MP) ve adventisia (1-3).

Epitelin kalınlığı mesanenin doluluk oranına göre değişir. Boş mesanede 6-7, dolu mesanede 2-3 hücre kalınlığındadır. Üç grup hücre içerir: Süperfisyel hücreler, intermedyer hücreler ve bazal hücreler.

Üriner boşluğa bakan ve şemsiye hücreleri olarak da adlandırılan süperfisyel hücreler büyük, eliptik hücrelerdir. Geniş, eozinofilik sitoplazmalı; tek ya da çift nükleusludurlar. Mesane doldukça yassılaşıp hatta görünmez olabilirler (1-4). Genellikle epitelin normal olduğunun bir kanıtı olarak kabul edilseler de cerrahi işlem sırasında dökülebildikleri için görülemeyebilirler ya da tam tersine belirgin bir karsinomun üzerini döşeyebilirler. Bu yüzden varlıkları ya da yoklukları bir malignite ölçütü olarak kullanılmamalıdır (1).

İntermedyer hücreler bazal membrana dik yerleşmiş; belirgin sitoplazmik sınırları olan, bol sitoplazmalı, oval nükleuslu hücrelerdir. Boş mesanede 4-5 sıralı izlenebildikleri halde mesane doldukça yassılaşıp tek sıralı bir görünüm alabilir, hatta görünmez olabilirler. En derinde kolumnar ya da kuboidal bazal hücreler bulunur.

LP bağ dokusu, elastik lifler, arterler, venler, lenfatik kanallar ve sinir uçlarından oluşur. Bazen, özellikle de damarların çevresinde düz kas lifleri izlenebilir. Bunlar genellikle düzensiz demetler şeklindedirler. Nadiren bir tabaka oluştururlar ve muskularis mukoza olarak adlandırılırlar. Biopsilerin ya da cerrahi materyallerin değerlendirilmelerinde bu yüzeysel kas liflerinin muskularis propriadan ayırt edilmeleri, evreleme ve dolayısıyla sağaltım hatalarını önlemek açısından son derece önemlidir.

MP sıklıkla sınırları net olarak seçilemeyen iç ve dış longitudinal ve orta sirküler kas tabakalarından oluşur (1-4). Bu tabakalar mesane boynunda, erkeklerde prostatın fibromuskuler stroması, kadınlarda ise üretra duvarının kas lifleri ile devam ederler (1).

En dış tabaka adventisia bir bağ dokusudur ve yalnızca süperior yüzejde pelvik parietal peritonun serozası ile örtülüdür (1,2).

DEĞİŞİCİ EPİTEL KARSİNOMU

Genel Özellikler

DEK, mesanenin tüm primer tümörlerinin % 90'ını oluşturur. Karsinomların çoğu gibi gelişimi hem genetik hem de çevresel faktörlere bağlıdır (2-6).

Genetik faktörlerin hiçbirisi spesifik olmamakla birlikte özellikle de yüksek dereceli DEK'lerin çoğunda 1., 3., 5., 7., 9., 11., 17. kromozomlarda ve Y kromozomunda sayısal ve yapısal anormallikler söz konusudur (4,5). 9. kromozomun ve p53 geninin DEK'lerin etiolojisinde rol oynayabileceklerini düşünülmektedir (5).

Çevresel faktörlerden ise özellikle kimyasal faktörlerin önemli olduklarına inanılır. İnsidansının endüstriyel bölgelerde yaşayanlarda, arilaminlere maruz kalanlarda ve sigara içenlerde daha fazla olduğu bildirilmiştir (2-6). Auerbach ve ark. da sigara içme alışkanlığı ile değişici epitelde nükleer atipi olması arasında korelasyon saptamışlardır (7). Sigaranın hangi komponentinin karsinojenik olduğu tam olarak bilinmemekle birlikte 2-naftilamin, nitrozaminler ve triptofan metabolitleri en çok kuşku edilenlerdir. İnsidansın puro ve pipo içenlerde artmaması inhalasyonun da önemli bir faktör olduğunu düşündürmektedir (2).

Diğer çevresel faktörler arasında aromatik aminler, özellikle de benzidin, beta-naftilamin, bifeniller ile auraminler, fenasetin ve siklofosamid bulunur (2-6). Schistosoma hematobium'un da mesanenin DEK'i ve skuamöz hücreli karsinomu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (2,4-6). İnsan Papillom Virüsünün (HPV) rolü tartışmalı olmakla birlikte şu anki bulgular bu tümörün ortaya çıkmasında çok da etkili olmadığı yönündedir (4-6).

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 (2). Ancak Armstrong ve Doll yüksek yağlı diyetle beslenenlerde DEK insidansının daha fazla olduğunu göstermişlerdir (8).

DEK genellikle çoğu 50 yaşın üstündeki hastalarda görülürse de genç erişkinlerde ve çocuklarda da bildirilmiştir (3-5). Bu ikinci grup tümörler sıklıkla daha düşük derecelidirler (4,5). Erkek/kadın oranı 3-4/1'dir (2,3,5,6). Beyaz ırkta diğer ırklara göre yaygındır (2,5).

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).

Morfolojik Özellikler

DEK'lerin mesane içinde en sık görüldükleri yer bazı yayınlara göre lateral duvarlar (3,4), bazı yayınlara göre ise mesane tabanıdır (5,6). Ancak divertiküller, hatta liyofilize dura yaması da dahil olmak üzere mesanenin her yerinde görülebilirler (4). Üreteral orifislerin çevresinde oldukları zaman bir ya da iki üreterin parsiyel ya da komplet blokajı sonucu hidronefroza ve pyelonefrite yol açabilirler (4).

Tek bir odakta (%75) ya da multipl olabilirler (3). Büyüme paternleri ekzofitik ve/veya endofitiktir. Ekzofitik DEK'ler, papiller ya da solid (nodüler) görünebilirler (2-4). Endofitik olanlar ise –özellikle de iyi diferansiye olduklarında– LP içinde *inverted papillom*, *sistitis glandularis/sistika* ya da *von Brunn adaları* ile karıştırılabilecek yuvalar oluşturabilirler (2,4,6). Bu görüntü bazı kaynaklarda *nested tipte DEK* olarak adlandırılmıştır (2,6). Papiller tümörler genellikle noninvaziv ve düşük dereceli; solid tümörler genellikle invazivdirler (3). 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). Lenfovasküler invazyonun retraksiyon artefaktından ayırt edilmesi ise çoğu zaman ancak immunhistokimyasal incelemelerle mümkün olur (2,4).

Bazı olgularda stromada lenfositik infiltrasyon izlenir. Bu infiltrasyon nadiren epitelyal komponenti gizleyecek ve malign bir lenfomayı taklit edebilecek kadar yoğun olabilir (4).

Bu tümörlerin çeşitli sitolojik ya da yapısal varyasyonları söz konusudur. Bunlardan görece sık görülen bir tanesi genellikle müsin içeren intrasitoplazmik vakuollerle karakterli glandüler metaplazidir (2,4-6). Ward (9), DEK'lerin %25-30'unda fokal müsin üretimi saptadığını rapor etmiştir. Bu vakuollerin genişlemesi ile nadiren mikrokistik patern gelişebilir (4-6). Diğer açılardan tipik bazı yüksek dereceli DEK'lerde de skuamöz metaplazi odakları ya da glikojenden zengin çok sayıda berrak hücre izlenebilir (2,4,5). Baskın olarak işsi hücrelerin oluşturduğu, yer

yer de sıradan görünümlü küçük DEK adaları içeren sarkomatoid (5,6); overin seröz papiller tümörlerini taklit eden mikropapiller (4,5); myelomla karışabilen plazmasitoid (4,6) ve son derece nadir rhabdoid veya hepatoid (5) varyantlar da bildirilmiştir. Stromada, kalsifikasyon; osteoid, kemik, kırıkta varlığı (5) ya da iğsi hücrelerle karakterli pseudosarkomatöz görünüm (5,6) sık değildir.

Derecelendirme

DEK'lerine ait bilinen ilk derecelendirme sistemi, 1922 yılında yayınlanan Broders derecelendirme sistemidir (10). O tarihten bu yana pekçok derecelendirme sistemi önerilmiş (Tablo 1) ancak hiçbirisi üzerinde tam bir görüş birliğine varılamamıştır.

Tablo 1: 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 (6)- <i>Papillom</i> , Düşük Dereceli Karsinom, Yüksek Dereceli Karsinom |
| 1998 | The World Health Organization/International Society of Urological Pathology (WHO/ISUP) 1998 (17)- <i>Papillom</i> , Düşük Malignite Potansiyelli Papiller Ürotelyal Neoplazm (DMPPÜN), Düşük Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom, Yüksek Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom |
| 1999 | WHO 1999 (18)- <i>Papillom</i> , DMPPÜN, Derece I, Derece II, Derece III |

Günümüzde en çok kullanılanlar Modifiye Bergkvist, Murphy, ve WHO/ISUP 1998 Consensus Classification of Urothelial (Transitional Cell) Neoplasms of the Urinary Bladder derecelendirme sistemleridir.

Modifiye Bergkvist:

Bergkvist derecelendirme sistemi ilk kez 1965 yılında Bergkvist ve ark. tarafından öne sürülmüş; 1987 yılında da Malmström ve ark. tarafından yeniden düzenlenmiştir (19).

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) (4,20). Derece 0 tümörler papillomları, derece I-IV tümörler ise karsinomları temsil ederler (3).

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 tanınmaz; mitoz çok sayıda ve bazıları atipik (20).

Murphy:

Murphy ve arkadaşlarına ait olan bu derecelendirme sistemi, ilk kez 1994 yılında Armed Forces Institute of Pathology'nin Atlas of Tumor Pathology kitabında yayınlanmıştır (2).

Tüm değişici epitel tümörleri için *Transizyonel Hücreli Neoplazm* terimini kullanır. Benign tümörleri papillom, malign tümörleri ise düşük ve yüksek dereceli karsinomlar olarak sınıflandırır.

Papillom: Genellikle ekzofitik, nadiren *inverted* gelişim gösterir. Ekzofitik olanlar ince fibrovasküler bir koron üzerinde, birkaç sıralı değişici epitel tabakasının izlendiği papiller yapılar ile karakterlidirler. Hücreler tamamen normal yapı ve sitolojide olabilirlerse de bu çok nadir bir durumdur. Çoğu lezyonda glikojeni azalmış ve bu yüzden sitoplazmik berraklığını kaybetmiş, çok sıralı intermedier hücreler ve bunları çevreleyen tek sıralı süperfisial hücrelerden oluşan bir epitel tabakası vardır. Hücre sınırlarının belirsiz, nükleusların eksantrik yerleşimli ve daha çok yuvarlak oldukları dikkati çeker. Nükleus sitoplazma oranı artmıştır ancak nükleer kalabalıklaşmanın olmaması ve nükleusların doku içinde düzenli dağılımları kuraldır. Nükleuslar arasında belirgin pleomorfizm yoktur. Kromatin ince granüler ve eşit dağılmış görünür. Geniş nükleole ya da sık mitozla rastlanmaz. *Inverted* olanlar ise yassılaştırmış, nonpapiller yüzey epitelinin altında; birbirleriyle anastomozlaşan değişici epitel trabekülleri ile karakterlidirler. Bu trabeküllerin arasında lamina propria alanları izlenir. Lezyonlar kas tabakasını infiltre etmezler. Büyük büyütmede trabeküllerin bazal hücrelerinin bazal membrana dik yerleştikleri dikkati çeker. Hücresel atipi sık olmakla birlikte genellikle hafif düzeydedir. Mitoz nadirdir.

Düşük Dereceli Karsinom: Baskın olarak papiller gelişim gösterir ve en iyi küçük büyütmede tanınır. Görece düzenli bir büyüme paterni ve anormal nükleuslar karakteristik bulgusudur. Hücreleri daha küçük olmasına rağmen nükleus sitoplazma oranı artmış olduğu için kesitlerde papillomdan daha yoğun görünür. Süperfisyel hücre sırası yassılaştırmış hatta tamamen kaybolmuş olabilirler. İntermedyer hücre sırası ise son derece değişkendir. Nükleer kümelenme, pleomorfizm, düzensiz dağılmış kromatin ve belirgin nükleol düşük dereceli karsinomun özellikleri olmamakla birlikte papillomdakinden biraz daha belirgindir. Mitozlar kolaylıkla saptanabilir.

Yüksek Dereceli Karsinom: Genellikle nodüler tümörlerdir. Papiller alanlar da içerebilirler. Hem değişici epitel ekspresyon oranları hem de varyasyonları (ossöz ve kartilajinöz metaplazi; skuamöz, glandüler ve nöroendokrin diferansiyasyon, müsin, hormon –özellikle de HCG– ve polipeptid üretimi gibi) çok çeşitlidir. Hücreleri değişik büyüklüklerde ve belirgin derecede eksantrik nükleuslu oldukları için nükleer kümelenme küçük büyütmede bile seçilebilir. Nükleus sitoplazma oranı sitoplazmanın dejenerasyonuna ya da vakuolizasyonuna bağlı olarak değişir.

Kromatin kaba granülerdir ve düzensiz dağılmıştır. Çoğu hücrede nükleol belirginliği dikkati çeker. Mitoz sıktır (5).

Transizyonel Hücreli Neoplazmaları değerlendirmede kullanılan kriterler ve karsinomların hücresel özellikleri Tablo 2 ve Tablo 3'te özetlenmiştir (5,6).

Tablo 2: Transizyonel Hücreli Neoplazmalar

| | Konfigürasyon | | Hücre Dağılımı | | Nükleer Özellikler | | | |
|-----------------|---------------|---------|----------------|-------|--------------------|----------|------|---------|
| | Papiller | Nodüler | Eşit | Değil | Pleomorfizm | Kromatin | | Nükleol |
| | | | | | | İnce | Kaba | |
| Papillom | +++ | 0 | +++ | 0 | + | +++ | + | +/- |
| Düşük Dereceli | ++ | + | +++ | 0 | + | ++ | +/- | + |
| Yüksek Dereceli | + | +++ | 0 | +++ | +++ | + | +++ | ++ |

0: yok; +/-: bazı tümörlerde olabilir; +: sporadik olarak olabilir; ++: çoğu tümörde var; +++: karakteristik özellik, hemen hemen tüm tümörlerde var.

Tablo 3: Murphy'e Göre Karsinomların Hücresel Özellikleri

| | Düşük Dereceli Karsinom | Yüksek Dereceli Karsinom |
|---------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Hücreler | | |
| Düzenlenme | Papiller/gevşek küme | İzole/gevşek küme |
| Büüklük | Artmış, uniform | Artmış, pleomorfik |
| Sayı | Çok | Değişken |
| Sitoplazma | Homojen | Değişken |
| Nükleus/Sitoplazma | Artmış | Artmış |
| Nükleus | | |
| Lokalizasyon | Ekzantrik | Ekzantrik |
| Büüklük | Geniş | Değişken |
| Morfoloji | Değişken | Değişken |

| | | |
|------------------|------------|------------------|
| Sınırlar | Düzensiz | Düzensiz |
| Kromatin | İnce, eşit | Kaba, eşit değil |
| Nükleolus | Küçük/yok | Değişken |

WHO/ISUP 1998:

Mostofi ve ark. tarafından öne sürülen bu derecelendirme sisteminde değişici epitel tümörleri *Papiller ve İnvaziv Ürotelyal Neoplazmlar* olarak iki ana gruba ayrılırlar.

Papiller Ürotelyal Neoplazmlar:

Ürotelyal Papillom: Tipik olarak gençlerde görülen, küçük ve genellikle izole bir lezyondur. Ekzofitik gelişim gösterir. Santral, fibrovasküler bir korun çevresinde normal kalınlıkta ve olağan sitolojik özellikler taşıyan ürotelyumun izlendiği papiller yapılarla karakterlidir. Hücre sıralarının sayısı önemli değildir.

Inverted Ürotelyal Papillom: Büyüme paterni dışında ürotelyal papillomun özelliklerini paylaşır. Nadiren lezyonun büyük kısmının ekzofitik geri kalanının ise inverted geliştiği hibrid olgular bildirilmiştir. Bu tür olguların ekzofitik ve inverted özellikleri olan papillomlar olarak adlandırılmaları önerilmektedir.

DMPPÜN: Minimal yapısal anormallikler ve minimal nükleer atipi içeren papillalarla 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.

Düşük Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom: Tamamı düzenli olmakla birlikte küçük büyütmede 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 LP'yi invaze edebilirler. Çoğunda nüks görülmekle birlikte ve <%5'i progresyon riski taşır.

Yüksek Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom: 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 disorganizdir. 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 CIS izlenebilir.

İnvaziv Ürotelyal Neoplazmlar:

İnvazyon, LP ve MP invazyonu olmak üzere iki aşamada değerlendirilir. Derecelendirme papiller tümörlerdeki gibidir (17).

Papiller Ürotelyal Neoplazmların sitolojik özellikleri Tablo 4'te özetlenmiştir (17).

Tablo 4: WHO/ISUP 1998'e Göre Papiller Ürotelyal Neoplazmlar

| | Nükleus | | | | Mitoz | Şemsiye H. |
|-----------------|----------------|---------------------------|--------------|--------------------------|----------------------|------------|
| | Boyut | Biçim | Kromatin | Nükleol | | |
| Papillom | Normal | Normal | İnce | - | - | + |
| DMPPÜN | Uniform, geniş | Uniform | İnce | Belirsiz | Bazalde | + |
| Düşük Dereceli | Değişken | Hafif pleomorfizm | Değişken | Belirsiz | Herhangi bir düzeyde | +/- |
| Yüksek Dereceli | Değişken | Orta/belirgin pleomorfizm | Hiperkromazi | Multipl belirgin nükleol | Herhangi bir düzeyde | +/- |

Tablo 5'te ve Tablo 6'da tüm bu derecelendirme sistemleri arasındaki geçişler gösterilmektedir (2,21).

Tablo 5: Derecelendirme Sistemlerinin Karşılaştırılması

| Murphy | WHO 1973/Koss | WHO/ISUP |
|-----------------|----------------------|-----------------|
| Papillom | Papillom | Papillom |
| Papillom | Derece I | DMPÜN |
| Düşük Dereceli | Derece II | Düşük Dereceli |
| Yüksek Dereceli | | Yüksek Dereceli |
| Yüksek Dereceli | Derece III | Yüksek Dereceli |

Tablo 6: Derecelendirme Sistemlerinin Karşılaştırılması

| WHO/ISUP 1998 | WHO 1973 | WHO 1999 |
|----------------------|-----------------|-----------------|
| Papillom | Papillom | Papillom |
| DMPÜN | Derece I | DMPÜN |
| | | Derece I |
| Düşük Dereceli | Derece II | Derece I |
| | | Derece II |
| Yüksek Dereceli | Derece III | Derece III |

İmmünohistokimya ve Diğer Özel Teknikler

DEK'lerin çoğu sitokeratin 8, 18; CEA, katepsin B, CA19-9, Leu-M1 ve hatta HCG ile pozitif immünreaksiyon verirler (4,6). Sarkomatoid tümörlerdeki iğsi hücrelerin vimentinle de boyandıkları bildirilmiştir (6).

ABO kan grup antijenlerinde delesyon özellikle de yüksek dereceli DEK'lerin sık bir bulgusudur. İlişkili başka bir anormallik normal ürotelyumda bulunmayan Lewis X antijeninin ekspresyonudur (4,6).

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

Evrelendirme

DEK 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 (22,23).

Primer Tümör (T)

TX Primer tümör saptanamadı.

T0 Primer tümör kanıtı yok.

Ta Noninvaziv, papiller

Tis Noninvaziv, flat (karsinoma in situ, CIS)

T1 LP'yi invaze etmiş

T2 MP'yi invaze etmiş

T2a: MP'nin iç ½' sini invaze etmiş

T2b: MP'nin dış ½' sini invaze etmiş

T3 Perivezikal yağ dokusunu invaze etmiş

T3a: Mikroskopik invazyon

T3b: Makroskopik invazyon

T4 Komşu organ/dokuları invaze etmiş

T4a: Prostat, uterus veya vajinayı invaze etmiş

T4b: 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 En büyük çapı 2 cm ya da daha az, tek bir lenf nodu metastazı

N2 En büyük çapı 2-5 cm arasında tek lenf nodu ya da en büyük çapı 5 cm'den büyük olmayan multipl lenf nodu metastazı

N3 En büyük çapı 5 cm'den büyük herhangi bir lenf nodu metastazı

Uzak Metastaz (M)

MX Uzak metastaz varlığı değerlendirilemedi

M0 Uzak metastaz

M1 Uzak metastaz var

DEK'ler en sık olarak bölgesel lenf nodlarına, akciğerlere, karaciğere, iskelet sistemine ve santral sinir sistemine metastaz yaparlar (3-5).

Evre

0A - TAN0M0

0İS- TİSN0M0

1 - T1N0M0

2 - T2N0M0

3 - T3 ya da T4a N0M0

4 - 4bN0M0 ya da TN1-N3 ya da TNM1

Sağaltım

DEK'lerin sağaltımı hastanın yaşı, taşıdığı cerrahi riskler; tümörün, derecesi, evresi ve mesane içinde herhangi bir yerde CIS ya da displazi olup olmadığı göz önüne alınarak planlanmalıdır (4).

Derece I ve II tümörler, MP invazyonu yapmamışlarsa transüretal rezeksiyon (TUR) ile sağaltılırlar (3,4). Özellikle multipl ya da rekürren olanlarda buna intravezikal kemoterapi ya da radyoterapi eklenebilir(4). Derece III ve IV tümörler, derecesi ne olursa olsun MP invazyonu yapmış tümörler ve konservatif sağaltıma yanıt vermeyen tümörler içinse en iyi seçenek radikal sistektomidir. Seçilmiş olgularda preoperatif kemoterapi veya radyoterapi ile kombine edilebilir (4).

Papiller ya da flat, LP invazyonu yapmamış tümörler için başlangıçta kuşkuyla karşılanırsa da günümüzde yaygın olarak kullanılan bir diğer yöntem de Calmette-Guerin bacillus (BCG) ile intravezikal immünoterapidir (2-4). BCG'nin özellikle tümör nüks oranını azaltmada oldukça başarılı olduğu bildirilmiştir (4). Son dönemlerde triethylene thiphosphoramide ve mitomycin C (MMC) gibi alkilleyici ajanlar üzerinde de durulmaktadır (6).

Parsiyel sistektomi rezidü mesanede yüksek nüks oranı nedeniyle (4); tek başına radyoterapi verilmesi ise radyoterapinin tümörün süperfisyel papiller komponenti oblitere etmekle birlikte invaziv komponentine etki yapamadığı, üstelik nükleer pleomorfizmi arttırdığı ve skuamöz metaplaziyi indüklediği gösterildiği (24) için artık önerilmemektedir.

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BELİRLEYİCİLER

p53

17. kromozomun kısa kolunun 13.1 bölgesine lokalize p53 tümör süpresör geni, 11 eksondan oluşur. p53 proteinini kodlar ve bu protein aracılığıyla DNA replikasyonunu, hücre proliferasyonunu ve hücre ölümünü düzenler (25-28)

p53 proteini 375 amino asitten oluşur, 53 kilodalton (Kd) ağırlığındadır (27,29). İlk kez 1979'da Lane ve Crawford, daha sonra da Linzer ve Levine tarafından, simian virus 40'ın büyük transformasyon antijeniyle (SV40 T antijeni) sıkı bir kompleks oluşturmuş bir fosfoprotein olarak tanımlanmıştır (30,31). 1990 sonrasında p53'ün normal büyümenin kontrolü ve tümör süpresyonunun moleküler temelindeki rolünü aydınlatan pekçok çalışma yapılmış ve 1993 yılında p53 Science dergisi tarafından yılın molekülü seçilmiştir. Son dönemde, p53 genindeki değişikliklerin erken dönemde saptanmasının önemi ve prognozun belirlenmesindeki rolüne yönelik araştırmalar üzerinde durulmaktadır (29).

Hücrelerde fizyolojik koşullarda az miktarda p53 proteini bulunur ancak hücre mutajenik ajanlarla karşılaştığında DNA hasarı gelişir. Post-translasyonal modifikasyonlar ile p53 proteini stabil hale gelir, nükleusta birikerek DNA'ya bağlanır, hücre siklusunun G₁ fazını durdurur (26,27,32). Bu duraklama, hasarlı DNA'nın onarımı için hücreye zaman kazandırır. Eğer onarım sağlanamazsa, p53 apoptozis yoluyla hücreyi ölüme götürür. Bu koruyucu görevinden dolayı p53'e "genomun gardiyanı" denmiştir (26,32). Mutasyona uğramış –ki bu mutasyonların %80'i bir bazın diğeriyle yer değiştirmesi şeklindeki "missense" mutasyonlardır (27)– ya da inaktive olmuş p53 içeren hücrelerde ise bölünme sırasında duraklama ya da apoptozis gerçekleşmeyeceği için hasarlı DNA replikasyona uğrar, mutasyon kalıcı hale gelir. p53'ün fonksiyon kaybı, diğer mutasyonlara da predispozisyon sağlar ve sonuçta malign klonlar üretilir (27,29).

Hücrenin p53 allellerinden biri mutant formdaysa, diğeri normal olsa bile "dominant negatiflik" söz konusu olur. Mutant allel, normal olanı da geçersiz hale getirir ve fonksiyonel p53'ün olmadığı bir durum ortaya çıkar. Mutasyonlar dışında, bazı DNA virüslerinin (SV40, adenovirüs, human papilloma virus) transforme edici proteinleri ile bazı onkogenlerin ürünleri de normal p53'e bağlanarak inaktivasyon sağlarlar (27).

p53 mutasyonlarının insanlarda görülen tümörlerdeki dağılımına ait pekçok çalışma vardır (25,26,33). Kolon kansinonlarının %50'den fazlası, meme ve akciğer kansinonlarının ise %50'ye yakınında p53 mutasyonu saptanmıştır. Bu üç tümör grubunu özofagus, over, pankreas, deri ve mide maligniteleri (%40–49), baş-boyun, mesane ve prostat kanserleri ile sarkomları (%30-39), hepatosellüler kansinom, beyin, adrenal, endometrium tümörleri ve mezotelyomalar (%22-29), böbrek, tiroid kansinonları, hematolojik maligniteler, karsinoid tümörler (%10-19), malign melanom, paratiroid tümörleri ve servikal kanserler (%10) izler (33).

Li-Fraumeni sendromunda p53 mutasyonları genetik geçiş gösterir. Hastalarda doğumda p53'ün bir allelinde mutasyon vardır ve yaşam sırasında her iki allelde mutasyonlar gösteren tümörler gelişir. Bu sendromda en sık saptanan tümör meme kansinomudur.

p53'ün insan tümörlerindeki yüksek prevalansı, malignite belirleyicisi olarak kullanılabileceği umudunu doğurmaktadır. DNA ya da RNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmasını izleyen direkt sekanslama (DNA dizi analizi), tek sarmal polimorfizm doğrulama analizi ya da immünohistokimyasal boyama, mutant p53'ün varlığını saptamada kullanılabilen yöntemlerdir. Sekanslama, tümörden alınan örneklerden, idrar ve balgam gibi vücut sıvılarından yapılabilir. Tek sarmal polimorfizm doğrulama analizi, nokta mutasyonlar içeren DNA sekanslarının elektroforezdeki akışındaki değişikliklerden yola çıkarak mutasyonların saptanmasını sağlamaktadır. İmmünohistokimyasal boyama, tümör hücrelerindeki mutant p53 proteininin aşırı miktarlara ulaşması temeline dayanır. Patoloji laboratuvarlarında rutin olarak uygulanabilen, diğerlerine göre daha kolay ve daha ucuz olduğu için tercih edilen bir yöntemdir. Biopsi, ameliyat materyalleri ve sitolojik materyallerin yanı sıra parafine gömülmüş dokuların retrospektif incelenmesine de olanak vermesi başlıca avantajıdır. Duyarlılığının %75, pozitif öngörü değerinin %63 olduğu gösterilmiştir.

p53 ile ilgili çalışmaların büyük bir kısmı, p53 mutasyonlarının prognostik önemini belirlemeye yöneliktir: Normal p53'ün tümör süpresör fonksiyonunun kaybı ile tümörün radyoterapiye ve kemoterapiye direnç kazanması ya da kötü prognozlu olması arasında ilişkili saptanmıştır. p53 mutasyonlarının bazı tümörlerde bağımsız bir prognostik faktör olduğunu vurgulayan çalışmalar da vardır (29). Bugün, p53 geni ile yapılacak kanser sağaltımının yüksek terapötik indekse sahip olabileceğini düşündüren araştırmalar yapılmaktadır (27,29).

DEK'lerde artmış p53 ekspresyonunun T1 tümörlerde progresyon ile ilişkili olduğu istatistiksel olarak ortaya konmuştur (34). Esrig ve ark. da, 253 radikal sistektomi materyali ile yaptıkları retrospektif bir çalışmada p53'ün T1, T2 ve T3 tümürlü hastalarda nüks ve yaşam süresi için bağımsız bir prognostik faktör olduğu göstermişlerdir (35). Literatürde bu sonucu destekleyen başka yayınlar da olmakla birlikte (36-39); DEK'lerde p53'ün herhangi bir prognostik değerinin olmadığını savunan çalışmalar da vardır (40,41)

Ki-67

İlk olarak 1984 yılında Gerdes ve ark. tarafından saptanan Ki-67, hücre siklusuna özgü antijenlerin önemli bir örneğidir (42,43). 10. kromozomun q25 bandında lokalize bir gen tarafından kodlanan ve 345 ve 395 Kd ağırlığında iki ayrı bölümden oluşan bu nonhiston protein, siklusa girmeyen hücrelerde bulunmazken; giren hücrelerin G₁ fazında artarak geç G₁, S, G₂ ve M fazlarında eksprese edilir (25,26,42-44).

İmmünohistokimyasal yöntemlerle frozen kesitlere ve/veya parafin bloklara uygulanabilen Ki-67 antijenine karşı geliştirilmiş MIB-1, MIB-2, MIB-3 monoklonal ve tavşan ve koyun poliklonal antikorları tümörlerin proliferasyon aktivitesini belirlemek için kullanılır (43). Bunun için Ki-67 ile pozitif boyanan tümör hücrelerinin tüm tümör hücrelerine oranı yüzde olarak belirtilip Ki-67 proliferasyon indeksi hesaplanır. Genel olarak bu indeksi yüksek olan tümörlerin daha agresif seyrettikleri gözlenmiştir. Meme, tiroid karsinomları ve lenfomalar gibi birçok tümörde Ki-67'nin immünohistokimyasal pozitiflik oranıyla tümörün histolojik derecesi arasında önemli bir ilişki saptanmıştır (27).

DEK'lerde de Ki-67 ekspresyonu ile histolojik derece ve evre arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir (42-49). Ki-67'nin nüks ve progresyonu belirlemede tek başına önemli olduğunu bildiren çalışmalar da vardır (25,26,49,50).

bcl-2

bcl-2 onkogeni, 18. kromozomun q21 bandında lokalizedir (51). Apoptozisi baskıladığı için hücre büyümesi ve proliferasyonunu uyaran onkogenler (myc, ras, abl genleri) ile hücre büyümesi ve proliferasyonunu inhibe eden tümör supresör genlerden (Rb, p53) farklı bir sınıfta incelenmiş ve apoptozis genleri olarak

adlandırılan yeni bir sınıfın temsilcisi olarak kabul edilmiştir (52). bax (bcl-2 associated X protein), bcl-xL, bcl-xS, mcl-1, bad ve bak (bcl-2 homologous antagonist/killer) bu sınıfın diğer üyeleridir (27).

Bazı araştırmacıların bcl-2'nin bir G proteini olduğunu, bazılarının ise bcl-2'nin antioksidan süreçleri düzenleyerek apoptozisi baskıladığını öne sürmelerine karşın bcl-2'nin apoptozisi nasıl bir düzenlekle inhibe ettiği henüz tam anlaşılamamıştır (53,54).

bcl-2 onkogeni, bcl-2 α ve bcl-2 β 'yi kodlayan iki ekzon içerir. Bcl-2 α , diğer hücrel onkogen ürünlerinden farklı olarak bir yüzey reseptörü olmamasına karşın hücre membranına bağlanır (54). bcl-2 gen yenisiziliminin ürünü olan 25 Kd ağırlığındaki bcl-2 proteini ise tüm onkogenler arasında yalnız bcl-2'ye özgü biçimde mitokondrinin iç membranında yerleşmiştir (53,56).

Değişici epitelin bazal hücreleri yanı sıra normal matür deride epidermisin bazal tabakasında, normal lenfositlerde, kemik iliğindeki tüm hemopoetik öncü hücrelerde, nöronlarda, memede hormona duyarlı duktus epitel hücrelerinde, barsak mukozasında kriplerin tabanındaki epitelde, tiroid, pankreas ve prostatta bez epitelinde, plasentada ve çoğu fetal dokuda bcl-2 boyanması gözlenir (57,58). Tüm bu hücre dizilerindeki ortak özellik, bcl-2 ile pozitif boyanan hücrelerin uzun yaşam süresine sahip progenitör hücreler olmaları, apoptotik hücre ölümünün olduğu alanlarda ise bcl-2 boyanmasının gözlenmediğidir. Bunlardan yola çıkarak bcl-2'nin hücrelerin gelişimi, matürasyonu ve diferansiyasyonunda büyük rol oynadığı, hücreleri apoptozisten koruduğu, dolayısıyla bcl-2 pozitifliğinin hücrelerin uzun yaşam süresi ile ilişkili olduğu yorumu yapılabilir (58).

Foliküler lenfomalar için tanısıl belirleyici kabul edilen ve diğer pekçok hemopoetik neoplazmda da izlenen bcl-2 immünreaktivitesi çeşitli tümör grupları ile ilgili çalışmalarla da konu olmuş ve iyi diferansiye meme ve kolon kansinomlarında kötü diferansiye tiplerden daha yüksek oranda saptanmıştır. Küçük hücreli akciğer kansinomlarındaki %77 pozitifliğin apoptozis inhibisyonu ve ilaç direnciyle ilişkili olduğu öne sürülmektedir (27). Mide ve prostat kanserlerinde de bcl-2 varlığı gösterilmiştir (59).

DEK'lerde bcl-2 ekspresyonu ile ilgili az sayıdaki çalışmanın sonuçları arasında ise tutarlılık yoktur. bcl-2'nin tek başına bir prognostik faktör olmamakla birlikte bcl-2/bax oranı ile nüks arasında güçlü bir korelasyon bulunduğunu bildiren yayınlar (25,60) yanında bcl-2 ile nüks arasında herhangi bir ilişki olmadığını öne

süren yayınlar da (61,62) vardır. bcl-2'nin prognozla ilişkisi de aynı şekilde tartışmalıdır (60,61).

p27^{Kip1}

Tümör hücrelerinin malign transformasyonu genetik değişikliklerle belirlenir. Özellikle son birkaç yıldaki ilerlemeler, kanser gelişimindeki kritik aşamanın normal hücre siklusundaki bozulma olduğunu göstermiştir (63-67). G1 fazından S fazına geçiş en önemli kontrol noktasıdır (66,67). Bu geçiş siklinler (3 tip siklin D ve siklin E), siklin bağımlı kinazlar (Cdk) ve Cdk inhibitörleri arasındaki etkileşimle düzenlenir (64,66).

Siklinler Cdk'lere bağlanarak onları aktive ederler. Aktive Cdk'ler retinoblastom gen proteininde fosforilasyona yol açarlar (64,67). Bu proteinin devre dışı kalması, –olasılıkla E2F gibi transkripsiyon faktörlerinin salınmasıyla– hücre siklusunu negatif yönde etkiler. Cdk inhibitörleri ise siklin-Cdk komplekslerine bağlanarak onları inaktive ederler (67). Cdk inhibitörleri ailesi INK4 ve Cip/Kip olmak üzere iki farklı kategoriye ayrılmıştır. Birinci kategoride yer alan p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} ve p19^{INK4d}, siklin D'nin Cdk4/6 kompleksine bağlanmasını; ikinci kategoride yer alan p21^{waf1/cip1}, p27^{Kip1} ve p57^{Kip2} ise siklinA/Cdk2, siklinE/Cdk2 ve diğer siklin/Cdk komplekslerini inhibe eder; hücre siklusunun ilerlemesi baskılanır (68,69). Steeg ve Abrams geç G1 fazından S fazına geçişte özellikle p27^{Kip1}'in merkezi bir rol oynadığını saptamışlardır (70).

p27^{Kip1}'nin düzenlenmesi postranskripsiyonel düzeyde olur (63,72). Tümör-spesifik mutasyonu olmamakla birlikte (63,64,71,72) lenfomalar; endokrin neoplazmlar; meme, akciğer, prostat, over, oral kavite, özofagus, mide karsinomları ve kolorektal karsinomlar gibi çeşitli tümörlerde ekspresyonun azaldığı bildirilmiştir (63,69,71,72). Özellikle meme, akciğer, over, prostat ve kolon karsinomlarında p27^{Kip1} immünohistokimyasal boyanmasının klinik prognozla iyi korelasyon gösterdiği öne sürülmektedir (63,69).

Son dönemlerde yapılan bazı çalışmalarda DEK'lerde düşük p27^{Kip1} ekspresyonunun kötü diferansiye derece, kas ve lenf nodu invazyonu ve kötü prognozla ilişkili olduğu görülmüştür (26,63,64,73,74). p27^{Kip1}'in bağımsız bir prognostik faktör olarak kabul edilebileceğini öne süren yayınlar da vardır (63,75). Başka bazı çalışmalarda ise p27^{Kip1}'in herhangi bir prognostik önemi olmadığı savunulmaktadır (68,69).

PROGNOZ

DEK'lerde en önemli prognostik faktörler mesane duvarına invazyonun derinliği ve tümörün diferansiyasyon derecesidir (2-4). Beş yıllık yaşam oranı TA tümörlü olgular için %90, T1 tümörlü olgular için %75 (2,3). T2 tümörlü olgular için bazı kaynaklara göre %40 (2) bazı kaynaklara göre %20-50 (3), T3 tümörlü olgular için %20 olarak bildirilmiştir (2). 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, konfigurasyonu, multifokalitesi, vasküler invazyon, ilişkili CIS varlığı ve lenf nodu tutulumu da prognozu etkileyen faktörlerdendir (2-4,6) Yaşamın ilk iki onyılında ortaya çıkan DEK'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 daha az agresif olma eğilimindedirler (2) 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 etmişler ($p<0,01$) (76). 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 sıfıra yakındır (4).

Son dönemlerde p53 ve Rb ekspresyonu, DNA ploidi ve hücre proliferasyonu üzerinde de durulmaktadır (2,4). Artmış p53 ekspresyonunun T1 tümörlerde progresyon ile ilişkili olduğu önerülmüştür (4). Azalmış Rb ekspresyonu agresif davranışla ilişkili olmakla birlikte bağımsız bir prognostik faktör olup olmadığı net değildir (4,25). 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). Ki-67 ekspresyonunun nüks ve progresyonu belirlemede tek başına önemli olduğu bildirilmiştir (25,26).

GEREÇ VE YÖNTEM

Olgular

Çalışmamızda, 1996-2002 yılları arasında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda DEK tanısı alan toplam 78 olguya ait 111 biopsi yer almaktadır. Biopsilerin 97'si TUR, 14'ü radikal sistektomi materyalidir. İmmünohistokimyasal olarak p53, Ki-67, bcl-2 ve p27^{Kip1} çalışılmıştır.

İmmünohistokimyasal Yöntem

İmmünohistokimyasal inceleme için tüm biopsilerden %10'luk tamponlanmış formalinde tespit edilmiş ve parafine gömülmüş dokulardan birer blok seçildi. Seçilen bloğun hemotoksilen-eosin (HE) kesitlerinin biopsinin tümör derecesini temsil eden blok olmasına özen gösterildi. 4 µ kalınlığında hazırlanan kesitler poly-L-lizine kaplı lamlar üzerine alındı. Lamlar etüvde 60°C'de 16 saat kurutuldu. Dört ksilol solüsyonu (10 dakika, 10 dakika, 15 dakika, 15 dakika) ve azalan yoğunlukta beş alkol solüsyonundan (absolü, %95, %80, %70, %50) geçirilerek deparafinize ve rehidrate edildikten sonra non-spesifik boyanmayı azaltmak amacıyla %3'lük hidrojen peroksidad solüsyonunda 10 dakika bekletildi. Ardından tris buffered saline (TBS) (pH 7,6, 0.05 M) solüsyonu ile 4 kez yıkandı ve her bir immünohistokimyasal belirleyici için önerildiği şekilde antijen açığa çıkarma işlemi uygulandı. Bu amaçla kesitler distile suda 5 dakika yıkanarak sodyum sitrat solüsyonu (pH 6,0) ile dolu şale içine yerleştirildi ve mikrodalga fırında (ev tipi), en yüksek enerjide (720 W) p53 için 3 kez; Ki-67, bcl-2 ve p27^{Kip1} için 4 kez, 5'er dakika tutuldu. Oda sıcaklığında 20 dakika soğutulan kesitler distile sudan geçirildikten sonra TBS ile 4 kez yıkandı. Non-spesifik zemin boyanmasını önlemek amacıyla oda sıcaklığında 10 dakika

protein bloklanması (DAKO, Peroksidaz Bloklayıcı Ayıraç, Kod No: S2001) uygulandı ve primer antikör uygulamasına geçildi.

Kesitler, insan p53 proteinine yönelik predilüe monoklonal fare antikoru DO-7 (NeoMarkers, MS-186-R7, Lot: 186R110) ve Ki-67 antijenine yönelik predilüe monoklonal tavşan antikoru (Dako, Kod No: N1574) ile 30 dakika, bcl-2 proteinine yönelik predilüe monoklonal fare antikoru (Neomarkers, MS-123-R7, Lot: 123R206) ve p27^{Kip1} proteinine yönelik predilüe monoklonal fare antikoru DCS-72.F6 (Neomarkers, MS-256-R7, Lot: 256R203) ile 45 dakika inkübe edildi. TBS ile 4 kez 5'er dakika yıkandı ve sekonder antikör işlemi için sırasıyla streptavidin-biotin (Lab Vision, Biotinlated Goat Anti-Mouse, Lot: MBN11206A) ve streptavidin-peroksidaz (Lab Vision Streptavidin Peroksidase, Lot: SHR11210) solüsyonlarında 15'er dakika inkübe edildi. İnkübasyonlar arasında yine TBS ile 4 kez 5'er dakika yıkandı. Ardından kromojen olarak diamin benzidin (Lab Vision, Lot: AHD21119) solüsyonunda 15 dakika bekletilip distile su ile yıkandı. Asitsiz ve alkolsüz Mayer hematoksileni ile zıt boyama yapıldıktan sonra musluk suyu ile yıkanarak alkollerden geçirildi. Lamlar kurutulduktan sonra Entellan ile kapatıldı.

Uygulama sırasındaki tüm inkübasyonlar oda sıcaklığında, nemli ve kapalı bir ortamda yapıldı.

İmmünreaktivitenin Değerlendirilmesi

Olguların klinik ve patolojik bulguları bilinmeksizin, standart ışık mikroskopunda x400 büyütme ile p53, bcl-2 ve p27^{Kip1} immünreaktivitesinin değerlendirilmesi için tüm preparatın değişik alanlarından; Ki-67 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi için preparatın en yoğun boyanan 3-5 alanından en az 1000 hücre sayılarak p53, Ki-67 ve p27^{Kip1} için nükleer, bcl-2 için sitoplazmik pozitiflik gösteren hücrelerin yüzdesi hesaplandı. Tüm nükleer boyanmalar, boyanma şiddetindeki farklılıklara bakılmaksızın pozitif kabul edildi. Bazı biopsilerde p53, Ki-67 ve p27^{Kip1} ile boyanmada sitoplazmik bir boyanma dikkati çekti. Artefakt olarak kabul edilen bu boyanmayı gösteren hücrelerde nükleusa sınırlı, daha koyu bir boyanma varsa pozitif olarak değerlendirildi. Kesitlerin yalnızca periferinde izlenen nükleer pozitiflik değerlendirme dışı tutuldu.

Boyanma yüzdesinin değerlendirmesinde; bcl-2 için boyanma skoru boyanma hücrelerin <%1'inde ise 0, %1-10'unda ise 1, %11-50'sinde ise 2, >%50'sinde ise 3 olarak değerlendirildi (Tablo 7).

Tablo 7: bcl-2'nin boyanma skoru

| Puan | Boyanma Yüzdesi |
|------|-----------------|
| 0 | 0 |
| 1 | 1–10 |
| 2 | 11–50 |
| 3 | 51–100 |

İç kontrol olarak bcl-2 için lenfositler ve –eğer varsa– normal ürotelyumun bazal hücreleri; p27^{Kip1} için lenfositler, endotel hücreleri ve normal ürotelyum kullanıldı.

Pozitif kontrol olarak p53 ve p27^{Kip1} için meme karsinomu, Ki-67 ve bcl-2 için normal tonsil dokusu seçildi.

Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde kişisel bilgisayarda çalışan SPSS (Statistical Package for Social Sciences) programının 10.0 versiyonu kullanıldı. Korelasyonun araştırılmasında Pearson'ın korelasyon testi, farklı serilerin anlamlılığının sınanmasında Student'in t testi uygulandı. Sonuçlar $p < 0.05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda 78 olguya ait, 97 TUR ve 14 radikal sistoprostatektomi materyalinden elde edilen 111 DEK; histolojik derece, LP, MP invazyonu, evre ve p53, Ki-67, bcl-2 ve p27^{Kip1} ekspresyonu açısından değerlendirildi. Olgular nüks (gelişim, süre, nükslerde histolojik derece ve invazyon progresyonu) ve ölüm (yaşıyor/öldü, ölüm süresi) açısından da ayrıca incelendi.

Yetmiş erkek (%89.7), 8'i kadın (%10,3) olan olguların yaşları 34–90 (Ort.: 66.2); izlem süreleri ise 1–72 ay (Ort.: 23,7) arasında değişiyordu. Otuzbeş olgu 6-24 doz (Ort.: 12,8) (1 doz: 120 mg) intravezikal BCG, 3 olgu ise 6 intravezikal MMC (1 doz: 40 mg) ek sağaltımı gördü. Yirmiyedi olguda (%34,6) 1-45 ay içinde (Ort.: 12,5) nüks gelişti. Üç olguda radikal sistoprostatektomi materyalinde, mikroskopik bir odağa sınırlı prostat adenokarsinomu izlendi. Onüç olgu (%16.7) 1–48 ay (Ort.:11,4) içinde tümörleri nedeniyle öldü. Sekiz olgu (%10,2) ise izlem sırasında kayboldu.

Histolojik derecelendirme Modifiye Bergkvist, Murphy, ve WHO/ISUP 1998 Consensus Classification of Urothelial (Transitional Cell) Neoplasms of the Urinary Bladder derecelendirme sistemlerine göre yapıldı. Olguların çoğunun Modifiye Bergkvist'e göre derece II ve derece III (Resim 1-5), Murphy ve WHO/ISUP 1998'e göre düşük dereceli (papiller ürotelyal) karsinom gruplarında; küçük bir bölümünün ise Modifiye Bergkvist'e göre derece IV (Resim 6, 7), Murphy'e göre Papillom (Resim 8, 9), WHO/ISUP 1998'e göre DMPPÜN (Resim 10) gruplarında oldukları görüldü. Derecelendirme sistemlerine göre materyalin ayrı ayrı dağılımları ilgili tablolarda gösterildi (Tablo 8–10).

Tablo 8: Değerlendirilen Materyalin Modifiye Bergkvist'e Göre Dağılımı

| | Olgu | | Biopsi | |
|---------------|-----------|--------------|------------|--------------|
| | Sayı | Yüzde | Sayı | Yüzde |
| Derece I | 7 | 9,0 | 7 | 6,3 |
| Derece IIA | 32 | 41,0 | 46 | 41,4 |
| Derece IIB | 15 | 19,2 | 19 | 17,1 |
| Derece III | 18 | 23,1 | 27 | 24,3 |
| Derece IV | 6 | 7,7 | 12 | 10,8 |
| Toplam | 78 | 100,0 | 111 | 100,0 |

Tablo 9: Değerlendirilen Materyalin Murphy'e Göre Dağılımı

| | Olgu | | Biopsi | |
|--------------------------|-----------|--------------|------------|--------------|
| | Sayı | Yüzde | Sayı | Yüzde |
| Papillom | 2 | 2,6 | 2 | 1,8 |
| Düşük Dereceli Karsinom | 39 | 50,0 | 53 | 47,7 |
| Yüksek Dereceli Karsinom | 37 | 47,4 | 56 | 50,5 |
| <i>Toplam</i> | 78 | 100,0 | 111 | 100,0 |

Tablo 10: Değerlendirilen Materyalin WHO/ISUP 1998'e Göre Dağılımı

| | Olgu | | Biopsi | |
|--|------|-------|--------|-------|
| | Sayı | Yüzde | Sayı | Yüzde |
| DMPPÜN | 6 | 7,7 | 6 | 5,4 |
| Düşük Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom | 35 | 44,9 | 49 | 44,1 |

| | | | | |
|---|-----------|--------------|------------|--------------|
| Yüksek Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom | 37 | 47,4 | 56 | 50,5 |
| <i>Toplam</i> | 78 | 100,0 | 111 | 100,0 |

Evrelendirme TNM sistemine göre yapıldı. Olguların büyük bir kısmının tanı anında T1 evresinde oldukları görüldü. Yalnızca 8 olguda mesane dışında tümör varlığı saptandı Bunların 4'ü perivezikal yağ dokusunda (Resim 11), 1'i prostatta (Resim 12), 2'si lenf nodunda (Resim 13) iken 1'i organ metastazı biçimindeydi. LP/MP invazyonuna ve evreye göre dağılım ayrı ayrı gösterildi (Tablo 11-12).

Tablo 11: Olguların İlk Biopsilerinin LP ve MP İnvazyonuna Göre Dağılımı

| | LP İnvazyonu | | MP İnvazyonu | |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Sayı | Yüzde | Sayı | Yüzde |
| 0* | 1 | 1,3 | 21 | 26,9 |
| 1** | 26 | 33,3 | 38 | 48,7 |
| 2*** | 51 | 65,4 | 19 | 24,4 |
| <i>Toplam</i> | 78 | 100,0 | 78 | 100,0 |

*: Biopsi LP/MP içermiyor, **: İnvazyon yok, ***: İnvazyon var

Tablo 12: Olguların İlk Biyopsilerinin TNM'ye Göre Dağılımı

| | Olgu | |
|----------|------|-------|
| | Sayı | Yüzde |
| <i>T</i> | | |
| TA | 27 | 34,6 |
| T1 | 32 | 41,0 |
| T2 | 14 | 17,9 |

| | | |
|----------|----|------|
| T3 | 4 | 5,1 |
| T4 | 1 | 1,3 |
| <i>N</i> | | |
| N0 | 76 | 97,4 |
| N1 | 2 | 2,6 |
| <i>M</i> | | |
| M0 | 77 | 98,8 |
| M1 | 1 | 1,28 |

Nüks gelişen olguların 1. ve 2. biopsileri karşılaştırıldığında; 7 olguda (%8,9) histolojik derecede, 2 olguda (%2,6) ise MP invazyonunda progresyon görüldü.

Tüm derecelendirme sistemleri ile LP, MP invazyonu ve ölüm arasında anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0,01$). Modifiye Bergkvist derecelendirme sistemi ile nüks süresi arasında da anlamlı negatif korelasyon görüldü ($p<0,05$) (Tablo 13).

Tablo 13: Olguların İlk Biopsilerinin Özellikleri

| n=78 | LP İnv. | MP İnv. | Nüks | Nüks Süresi | Ölüm | Ölüm Süresi |
|----------------------|----------|----------|------|-------------|----------|-------------|
| <i>MB</i> | $p<0,01$ | $p<0,01$ | A | $p<0,05$ | $p<0,01$ | A |
| Murphy | $p<0,01$ | $p<0,01$ | A | A | $p<0,01$ | A |
| WHO/ISU P | $p<0,01$ | $p<0,01$ | A | A | $p<0,01$ | A |

A: Anlamsız

LP ve MP invazyonları ile nüks, nüks süresi; ölüm ve ölüm süresi arasında herhangi bir korelasyon yoktu.

p53 Boyanma Özellikleri

Toplam 111 biopsinin 95'inde (%85,6) tümör dokusunda p53 ekspresyonu izlendi, 16'sında yetersiz preparat kalitesi nedeniyle güvenilir boyanma elde edilemedi. Boyanma oranı % 1–99 (Ort.: 47,3 SD: 32,9) arasında değişiyordu (Resim 14, 15).

Boyanma oranlarının her derecelendirme sistemine göre dağılımı Tablo 14'te verildi. Buna göre Modifiye Bergkvist derecelendirme sistemi sözkonusu olduğunda yalnızca derece IIA tümörlerle derece III tümörler arasındaki boyanma farkının anlamlı olduğu görüldü ($p<0,01$). Murphy ve WHO/ISUP derecelendirme sistemlerine göre ise düşük ve yüksek dereceli tümörler arasındaki boyanma farkının anlamlı olduğu saptandı (her ikisi de $p<0,05$).

p53 boyanma oranı T3 tümörlerde oldukça yüksek olmakla birlikte (Tablo 15) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

Tablo 14: p53 Boyanma Oranlarının Dereceye Göre Dağılımı

| n=101 | p53 | |
|---------------------------|------|-----------------|
| | Sayı | Boyanma Oranı |
| Modifiye Bergkvist | | |
| Derece I | 7 | % 50,27 (15–92) |
| Derece IIA | 39 | % 32,69 (3–83) |
| Derece IIB | 17 | % 51,82 (0–99) |
| Derece III | 25 | % 63,48 (6–98) |
| Derece IV | 7 | % 57,42 (15–97) |
| Murphy | | |
| Papillom | 2 | % 56,00 (20-92) |
| Düşük Dereceli | 46 | % 35,54 (3–85) |
| Yüksek Dereceli | 47 | % 58,51 (0–99) |
| WHO/ISUP | | |
| DMPPÜN | 6 | % 37,83 (15–92) |
| Düşük Dereceli | 42 | % 36,19 (3–85) |
| Yüksek Dereceli | 47 | % 58,51 (0–99) |

Tablo 15: p53 Boyanma Oranlarının Evreye Göre Dağılımı

| Evre | Olgu Sayısı | Boyanma Oranı |
|------|-------------|---------------|
| TA | 34 | 43,23 (0–98) |
| T1 | 38 | 46,89 (0–99) |
| T2 | 15 | 48,40 (2–98) |
| T3 | 8 | 64,87 (15–95) |

p53 ile diğer immünohistokimyasal belirleyiciler karşılaştırıldığında p53 ve Ki-67 arasında anlamlı pozitif korelasyon saptandı ($p<0,05$).

Ki-67 Boyanma Özellikleri

Toplam 111 biopsinin 101'inde (%90,09) tümör dokusunda Ki-67 ekspresyonu izlendi, 10'nunda yetersiz preparat kalitesi nedeniyle güvenilir boyanma elde edilemedi. Boyanma oranı % 1-97 (Ort.: 26,06 SD:20,8) arasında değişiyordu (Resim 16-18).

Ki-67 ile tüm derecelendirme sistemlerine göre derece arasında anlamlı bir korelasyon olduğu ($p<0,01$) ve Ki-67 boyanma oranının derece arttıkça arttığı görüldü. Ayrıca Ki-67'nin tüm derecelendirme sistemleri için dereceyi öngörmeye bağımsız bir değişken olduğu belirlendi. Boyanma oranlarının her derecelendirme sistemine göre dağılımı Tablo 16'da verildi.

Tablo 16: Ki-67 Boyanma Oranlarının Dereceye Göre Dağılımı

| n=101 | Ki-67 | |
|---------------------------|-------|-----------------|
| | Sayı | Boyanma Oranı |
| Modifiye Bergkvist | | |
| Derece I | 7 | % 6,57 (1–25) |
| Derece IIA | 42 | % 18,14 (2–45) |
| Derece IIB | 17 | % 22,05 (7–55) |
| Derece III | 25 | % 39,92 (8–90) |
| Derece IV | 10 | % 45,20 (10–97) |

| Murphy | | |
|-----------------|----|----------------|
| Papillom | 2 | % 5,50 (3–8) |
| Düşük Dereceli | 49 | % 17,08 (1–45) |
| Yüksek Dereceli | 50 | % 35,70 (7–97) |
| WHO/ISUP | | |
| DMPPÜN | 6 | % 10,66 (1–25) |
| Düşük Dereceli | 45 | % 17,42 (2–45) |
| Yüksek Dereceli | 50 | % 35,70 (7–97) |

Ki-67 ile evre arasında da paralellik olduğu ve Ki-67 boyanma oranının evre arttıkça arttığı görülmekle birlikte (Tablo 17) yalnızca TA tümörler ile T2 tümörler ve yine TA tümörler ile T3 tümörler arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı idi (Tablo 18).

Tablo 17: Ki-67 Boyanma Oranlarının Evreye Göre Dağılımı

| n=101 | Sayı | Boyanma Oranı |
|--------------|-------------|----------------------|
| TA | 37 | % 19,83 (1–80) |
| T1 | 39 | % 25,15 (5–97) |
| T2 | 16 | % 34,00 (7–70) |
| T3 | 9 | % 41,55 (9–85) |

Tablo 18: Ki-67 ile Evre Grupları Arasındaki İstatistiksel İlişkiler

| | TA | T1 | T2 | T3 |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| TA | – | A | p=0,021 | p=0,020 |

A: Anlamsız

Ki-67 ile diğer immünohistokimyasal belirleyiciler karşılaştırıldığında Ki-67 ve p53 arasında anlamlı ($p<0,05$) pozitif, Ki-67 ve p27^{Kip1} arasında ise anlamlılık sınırında ($p=0,057$) negatif korelasyon saptandı.

bcl-2 Boyanma Özellikleri

Toplam 111 biopsinin 95'inde (%85,6) tümör dokusunda bcl-2 ekspresyonu izlendi, 16'sında yetersiz preparat kalitesi nedeniyle güvenilir boyanma elde edilemedi. Papillaların bazalinde daha yoğun bir boyanma izlenmekle birlikte boyanma skoru genellikle 0 (Resim 19) ya da 1; üç biopside ise 3 (Resim 20, 21) olarak değerlendirildi. Dağılım Tablo 19'da verildi.

Tablo 19: Değerlendirilen Materyalin bcl-2 Boyanma Skorları

| bcl-2 | Sayı | Yüzde |
|---------------|-------------|--------------|
| 0 (<% 1) | 44 | 39,6 |
| 1 (%1-10) | 43 | 38,7 |
| 2 (%11-50) | 5 | 4,5 |
| 3 (>%50) | 3 | 2,7 |
| Toplam | 95 | 85,6 |

bcl-2 ile herhangi bir derecelendirme sistemine göre derece arasında anlamlı bir ilişki yoktu. Ancak bcl-2 ekspresyonu ile evre arasında anlamlı negatif korelasyon ($p<0,05$) saptandı.

bcl-2 ile diğer immünohistokimyasal belirleyiciler karşılaştırıldığında bcl-2 ve p27^{Kip1} arasında anlamlı pozitif korelasyon görüldü ($p<0,01$).

p27^{Kip1} Boyanma Özellikleri

Toplam 111 biopsinin 100'ünde (%90) tümör dokusunda p27^{Kip1} ekspresyonu izlendi, 11'inde yetersiz preparat kalitesi nedeniyle güvenilir boyanma elde edilemedi. Boyanma oranı % 0–80 (Ort.: 24,3 SD: 20,5) arasında değişiyordu (Resim 22, 23). Genellikle homojen bir boyanma izlenmekle birlikte 16 olguda tümörün paterni ile ilişkili heterojen boyanma dikkati çekti. İki non-invaziv papiller tümörde, papillaların

süperfişyel hücrelerinde (Resim 24) bazal tabakaya göre daha yüksek oranda p27^{Kip1} pozitifliği saptandı. 6 invaziv tümörde ise en derin bölümlerde ekspresyon kaybı vardı (Resim 25).

p27^{Kip1} ile modifiye Bergkvist'e göre derece arasında anlamlı bir ilişki olduğu (p<0,05) ve p27^{Kip1} boyanma oranının derece arttıkça azaldığı görüldü. p27^{Kip1} ile Murphy ve WHO/ISUP'a göre derece arasında anlamlı bir ilişki görülmedi.

Boyanma oranlarının evreye göre dağılımı Tablo 20'de verildi. TA ile T2 ve T1 ile T2 olgu grupları arasındaki boyanma farkının sınırda anlamlılık gösterdiği, TA ile T3; T1 ile T3 olgu grupları arasında ise belirgin bir fark olduğu dikkati çekti (Tablo 21).

Tablo 20: p27^{Kip1} Boyanma Oranlarının Evreye Göre Dağılımı

| n=100 | Sayı | Boyanma Oranı |
|-------|------|----------------|
| TA | 36 | % 26,16 (0–80) |
| T1 | 39 | % 31,00 (0–70) |
| T2 | 16 | % 14,31 (1–60) |
| T3 | 9 | % 6,33 (0–17) |

Tablo 21: p27^{Kip1} ile Evre Grupları Arasındaki İstatistiksel İlişkiler

| | TA | T1 | T2 | T3 |
|----|---------|---------|---------|---------|
| TA | – | A | p=0,057 | p=0,021 |
| T1 | A | – | p=0,046 | p=0,006 |
| T2 | p=0,057 | p=0,046 | – | A |
| T3 | p=0,021 | p=0,006 | A | – |

A: anlamsız

p27^{Kip1} ile diğer immünohistokimyasal belirleyiciler karşılaştırıldığında p27^{Kip1} ve Ki-67 arasında anlamlılık sınırında (p=0,057) negatif korelasyon ve p27^{Kip1} ile bcl-2 arasında anlamlı (p<0,01) pozitif korelasyon izlendi.

Nüks gelişen olguların ilk biopsileri ile ikinci biyopsileri ayrı ayrı gruplandırıldığında; gruplar arasında immünohistokimyasal belirleyicilerin boyanma oranları açısından anlamlı bir fark saptanmadı. Çok az sayıda olguda histolojik derece ya da invazyon progresyonu izlendiği için progresyon gösteren olgularla progresyon göstermeyen olgular arasındaki boyanma oranları karşılaştırılmadı.

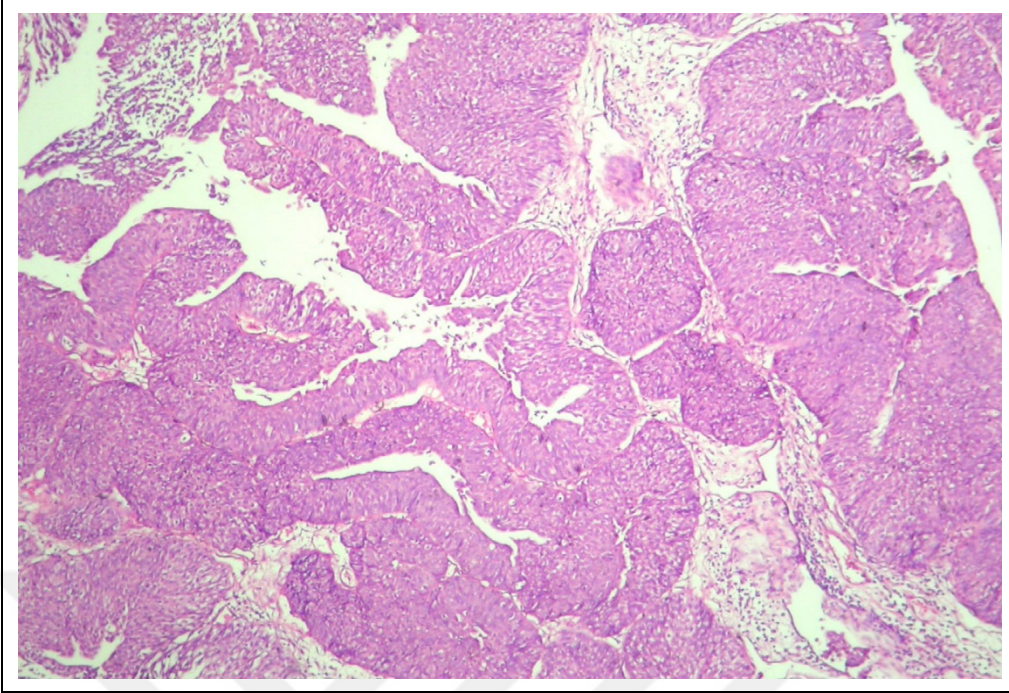
İzlem süreleri 24 ay veya daha fazla olan olgularla (n=32) ölen olgular (n=13) ayrı ayrı gruplandırıldığında ise gruplar arasında Ki-67 ve p27^{Kip1} boyanma oranları açısından anlamlı bir fark olduğu görüldü (sırasıyla p<0,05 ve p<0,01). p53 ve bcl-2 boyanma oranları açısından anlamlı bir fark saptanmadı.

İmmünohistokimyasal belirleyiciler birbirleriyle karşılaştırıldığında p53 ve Ki-67 arasında ve bcl-2 ile p27^{Kip1} arasında anlamlı pozitif korelasyon; Ki-67 ve p27^{Kip1} arasında ise anlamlılık sınırında negatif korelasyon saptandı (Tablo 22).

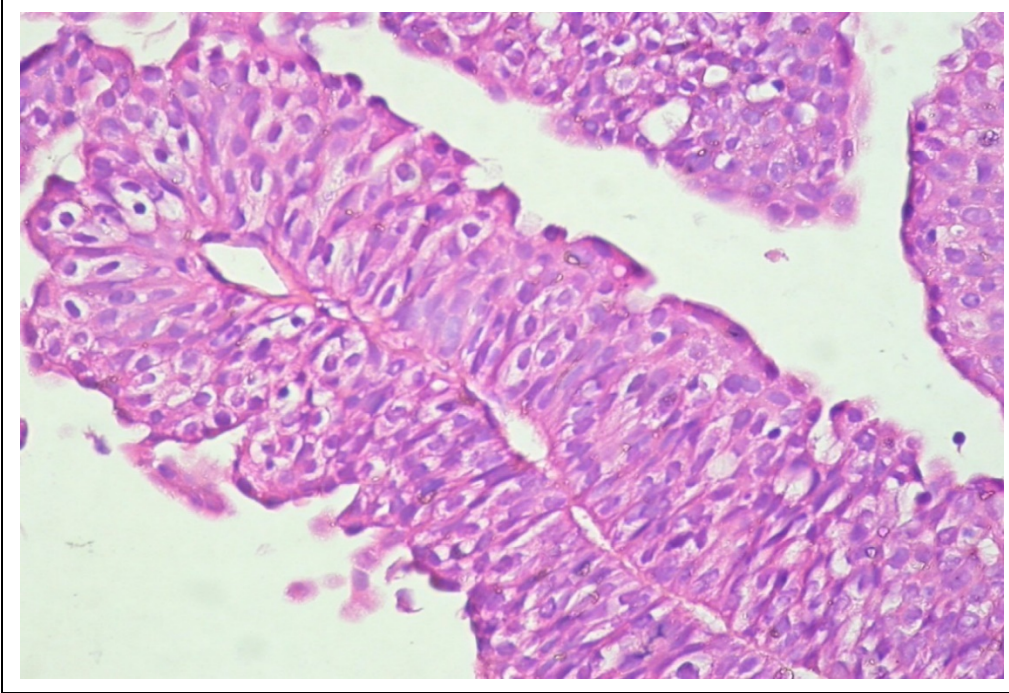
Tablo 22: İmmünohistokimyasal Belirleyicilerin Birbirleriyle Korelasyonu

| n=111 | p53 | Ki-67 | bcl-2 | p27 ^{Kip1} |
|---------------------|--------|---------|--------|---------------------|
| p53 | – | p<0,05 | A | A |
| Ki-67 | p<0,05 | – | A | p=0,057 |
| bcl-2 | A | A | – | p<0,01 |
| p27 ^{Kip1} | A | p=0,057 | p<0,01 | – |

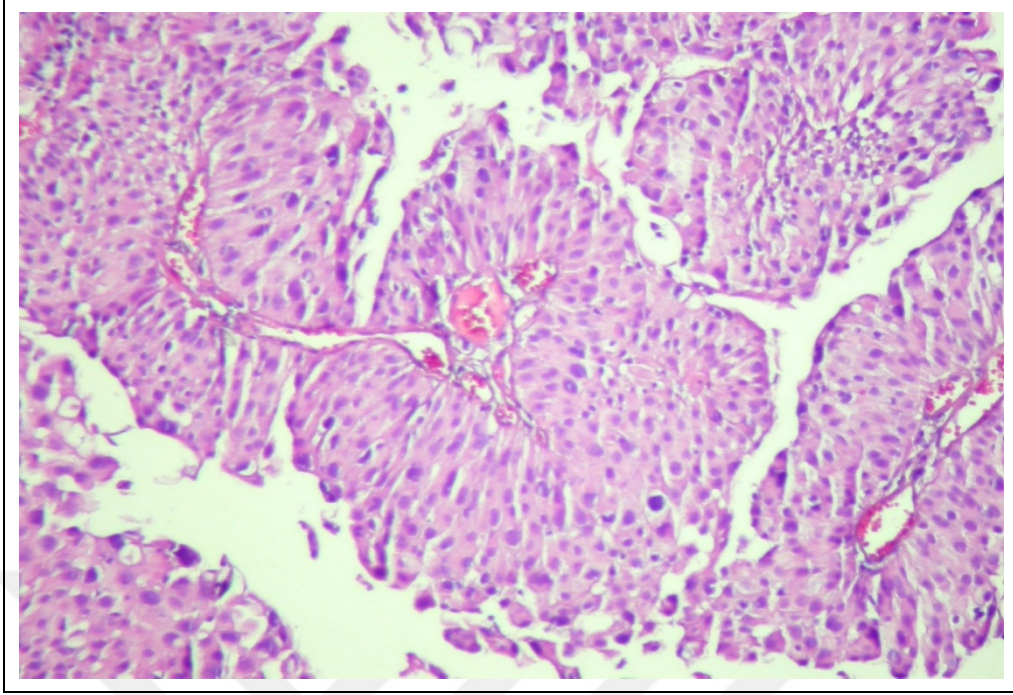
A: Anlamsız



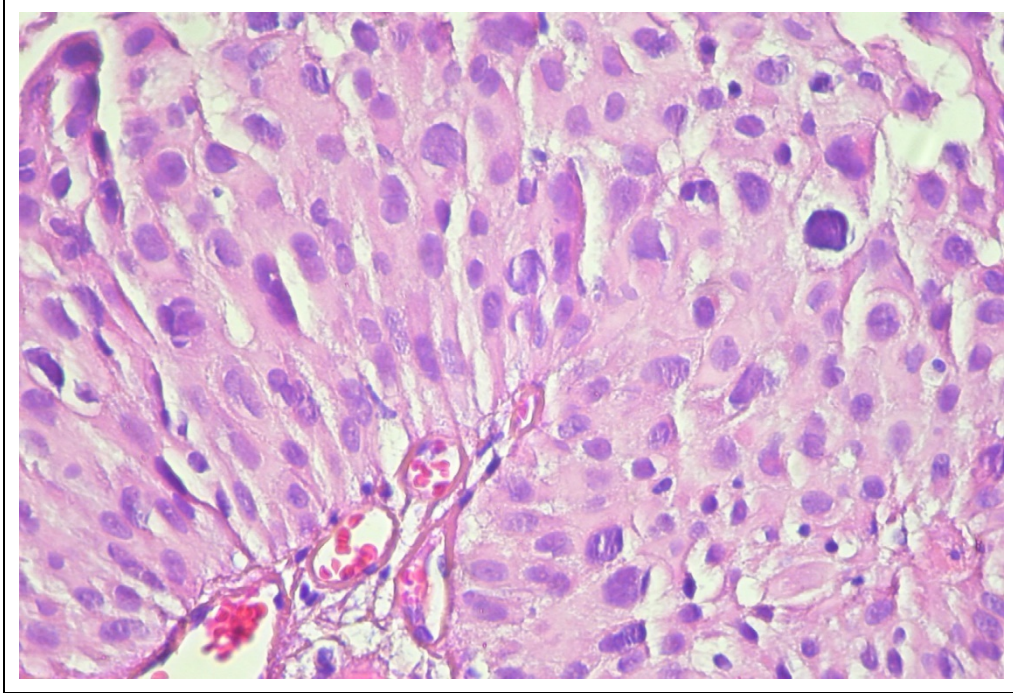
Resim 1: Modifiye Bergkvist'e göre derece IIA DEK, H&E, x40



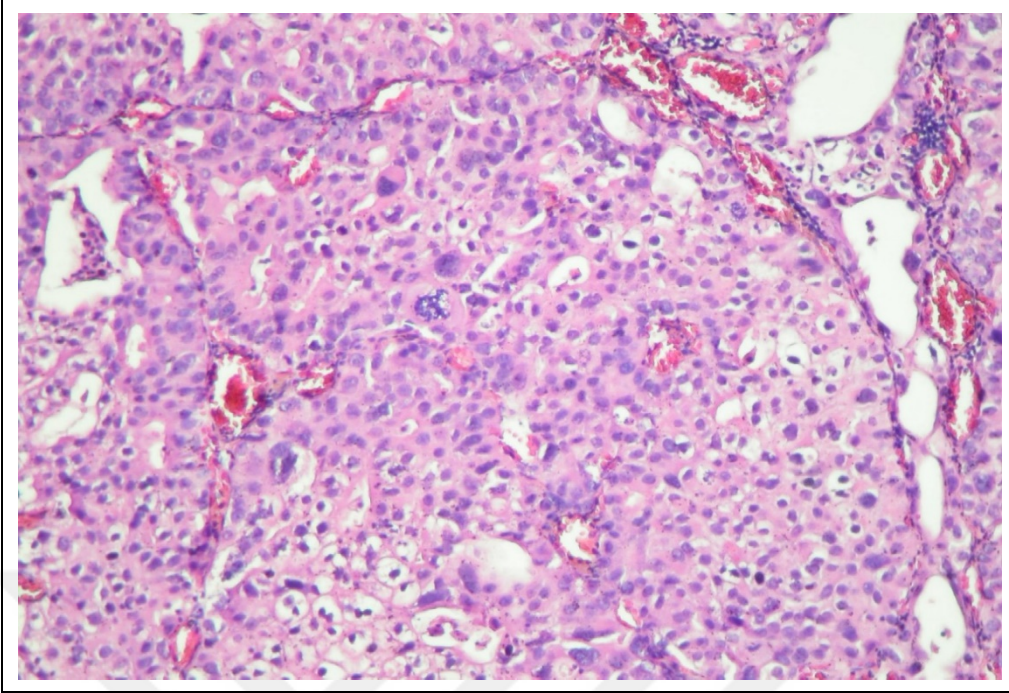
Resim 2: Modifiye Bergkvist'e göre derece IIA DEK, H&E, x200



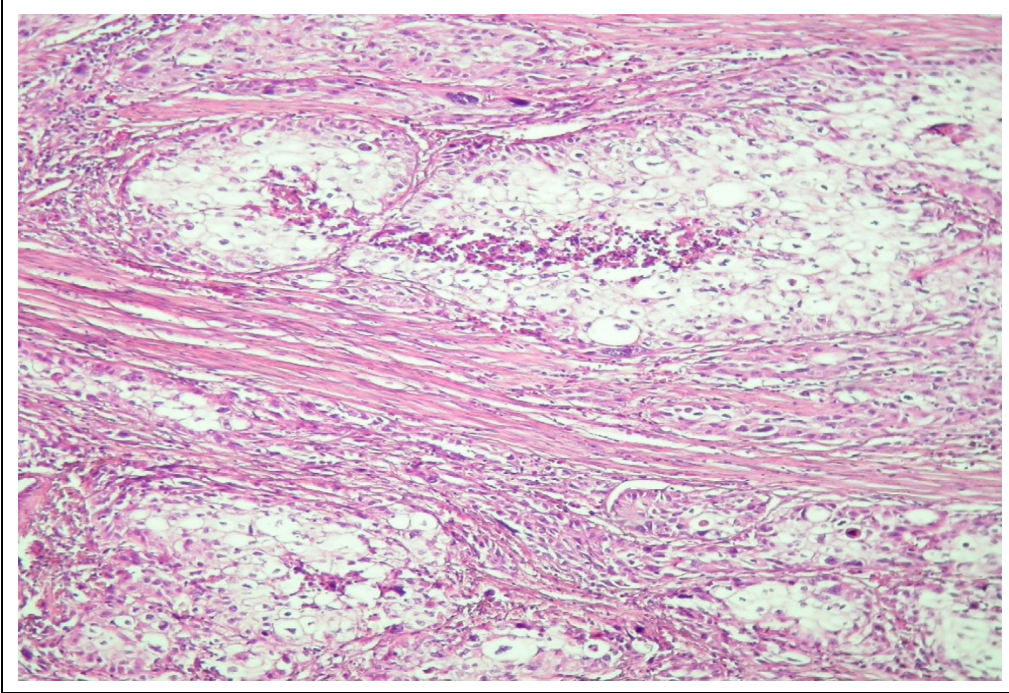
Resim 3: Modifiye Bergkvist'e göre derece IIB DEK, H&E, x100



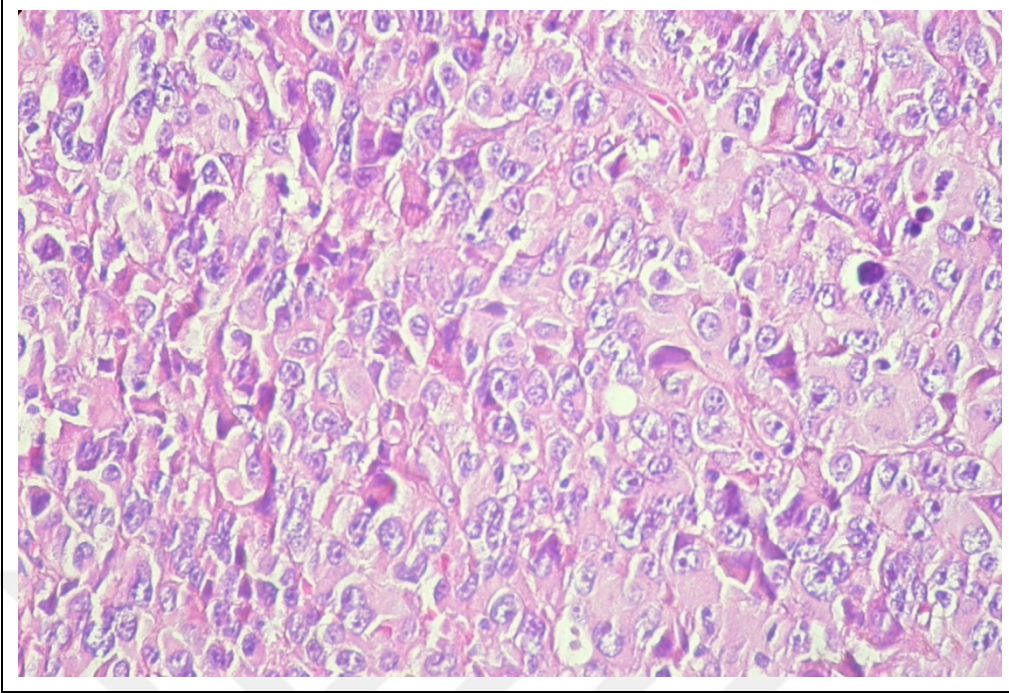
Resim 4: Modifiye Bergkvist'e göre derece IIB DEK, H&E, x400



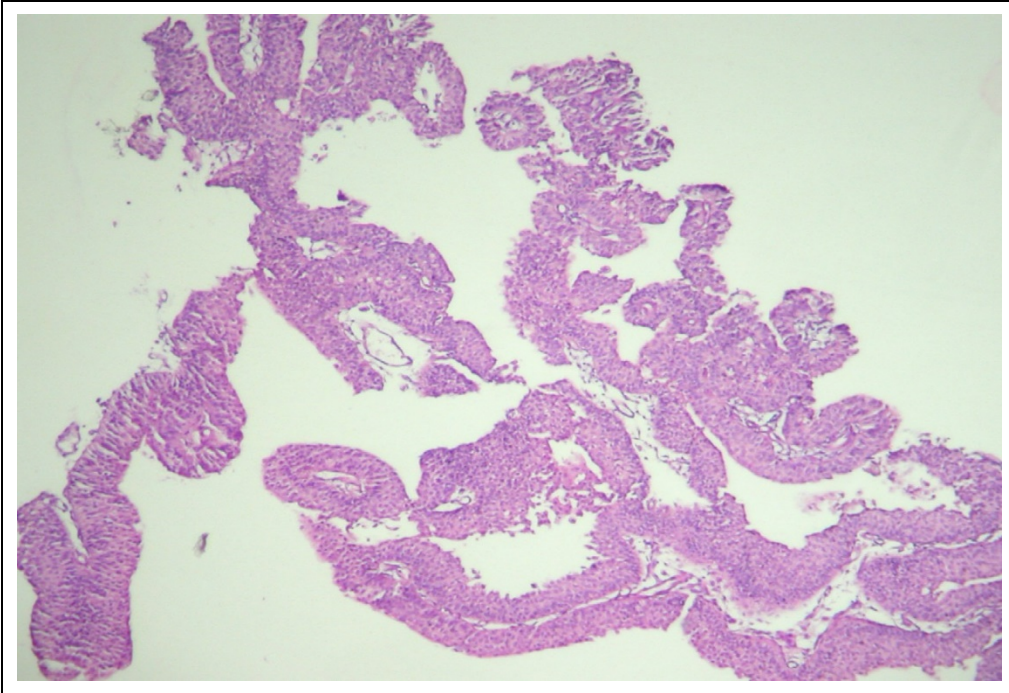
Resim 5: Modifiye Bergkvist'e göre derece III DEK, H&E, x200



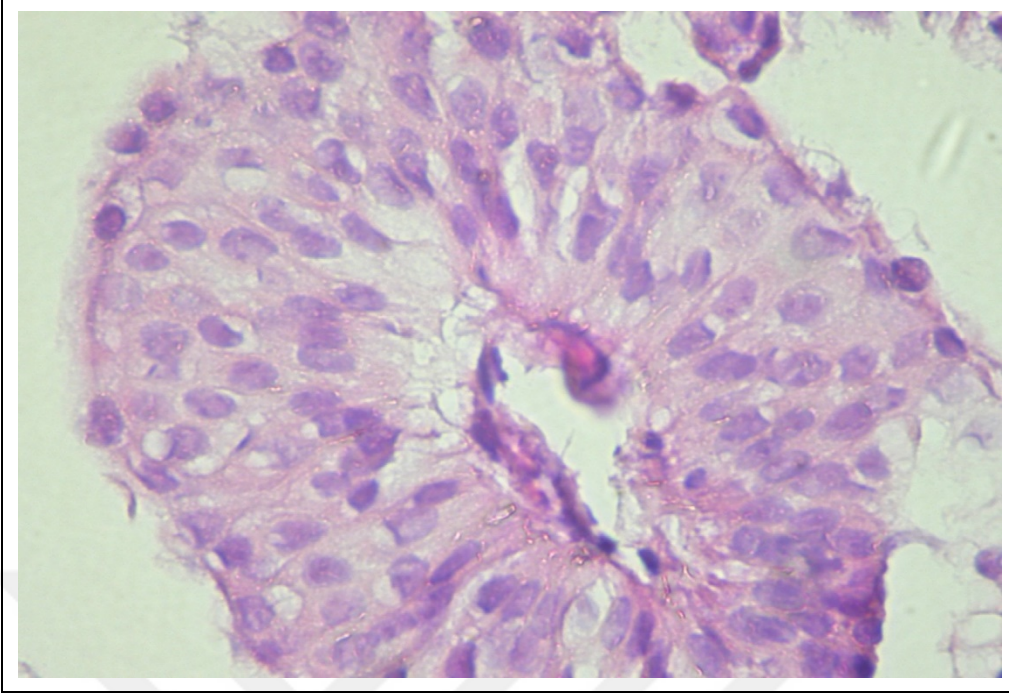
Resim 6: Berrak hücre metaplazisi gösteren, modifiye Berkvist'e göre derece IV DEK, H&E, x100



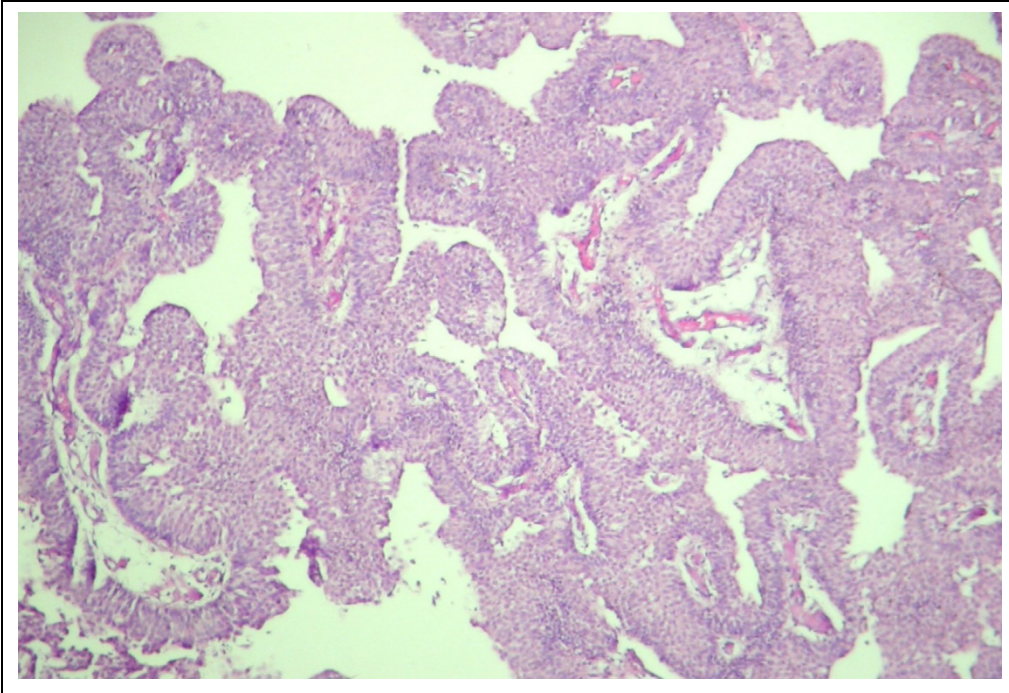
Resim 7: Modifiye Bergkvist'e göre derece IV DEK, H&E, x400



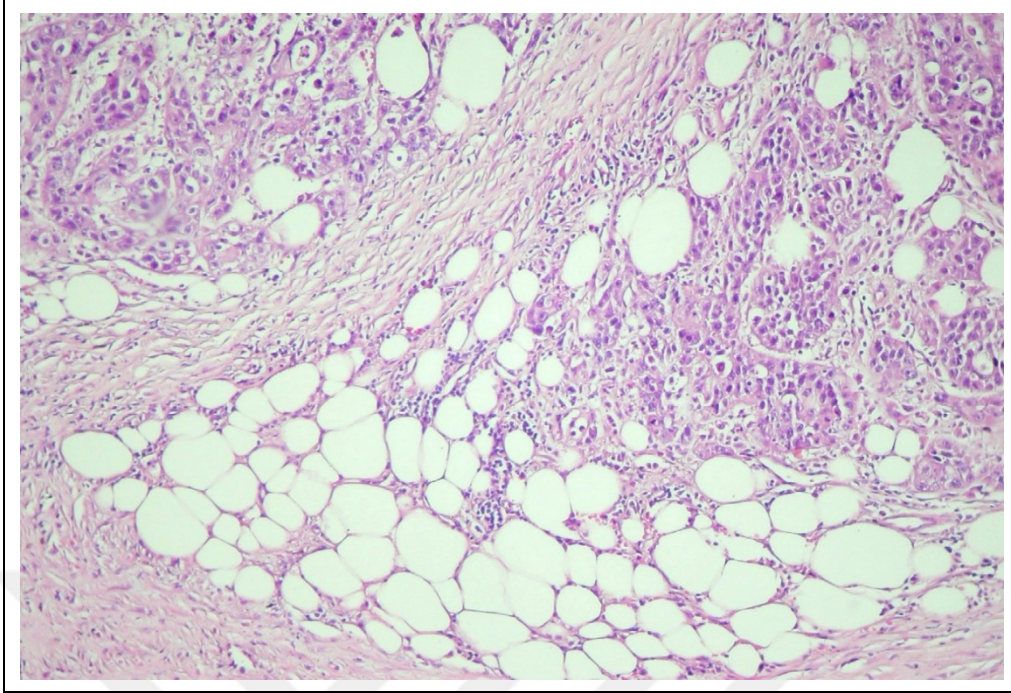
Resim 8: Murphy'e göre papillom, H&E, x40



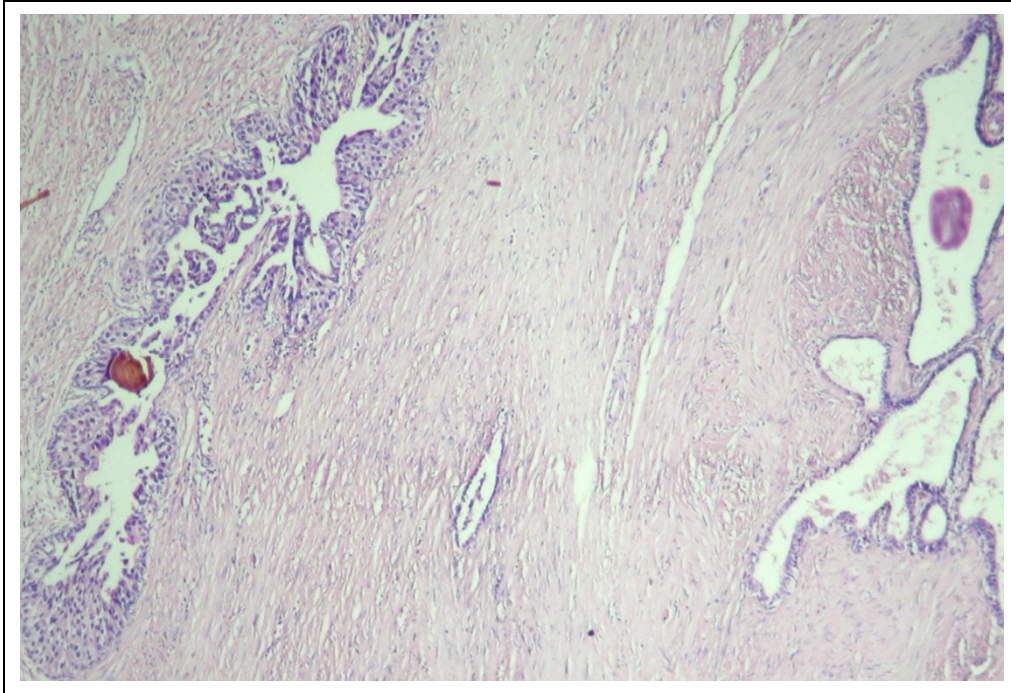
Resim 9: Murphy'e göre papillom, H&E, x400



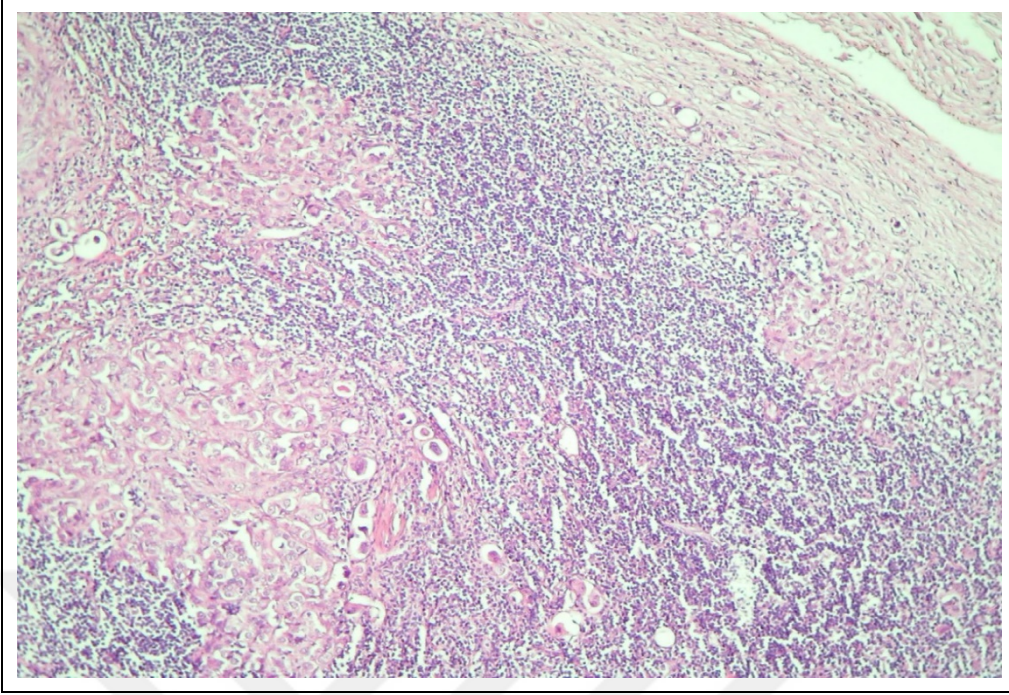
Resim 10: WHO/ISUP 1998'e göre DMPPÜN, H&E, x40



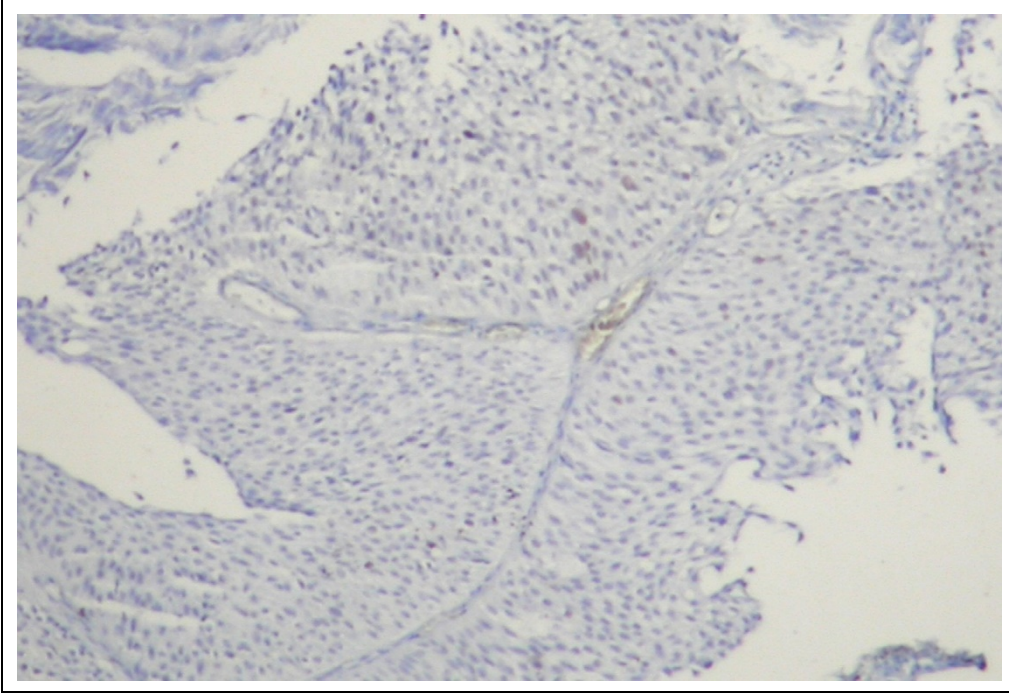
Resim 11: Perivezikal yağ dokusu tutulumu, H&E, x100



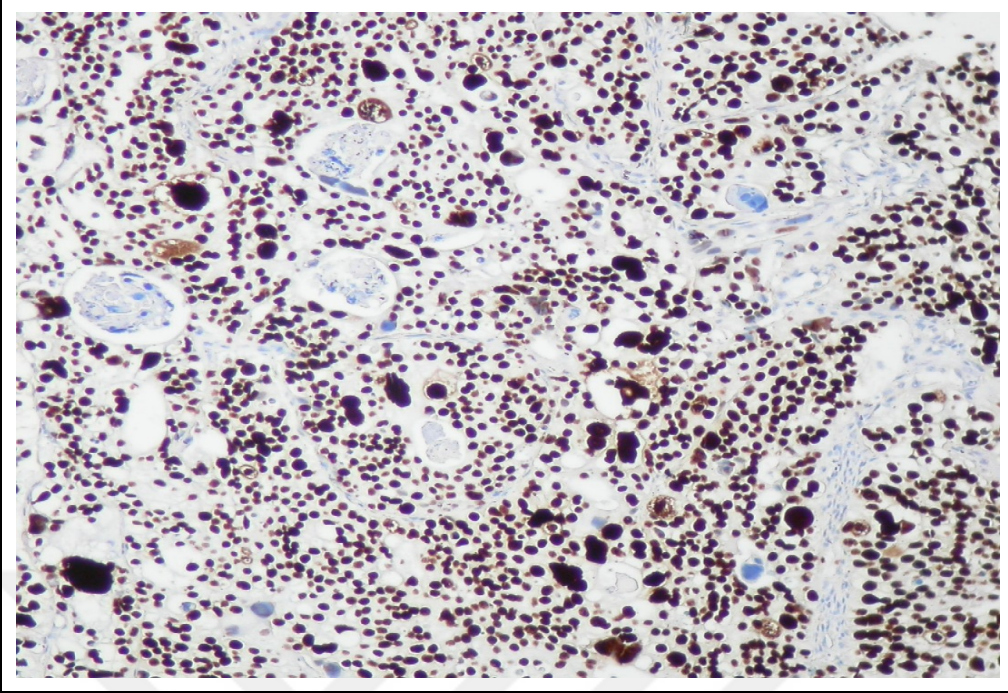
Resim 12: Prostat tutulumu, H&E, x100



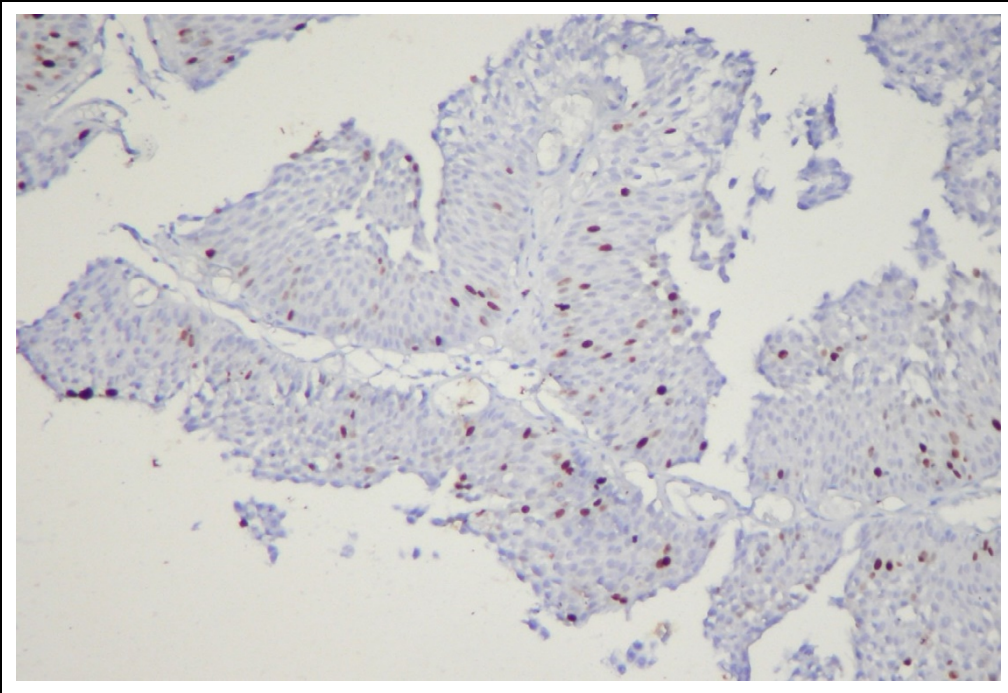
Resim13: Lenf nodu tutulumu, H&E,x100



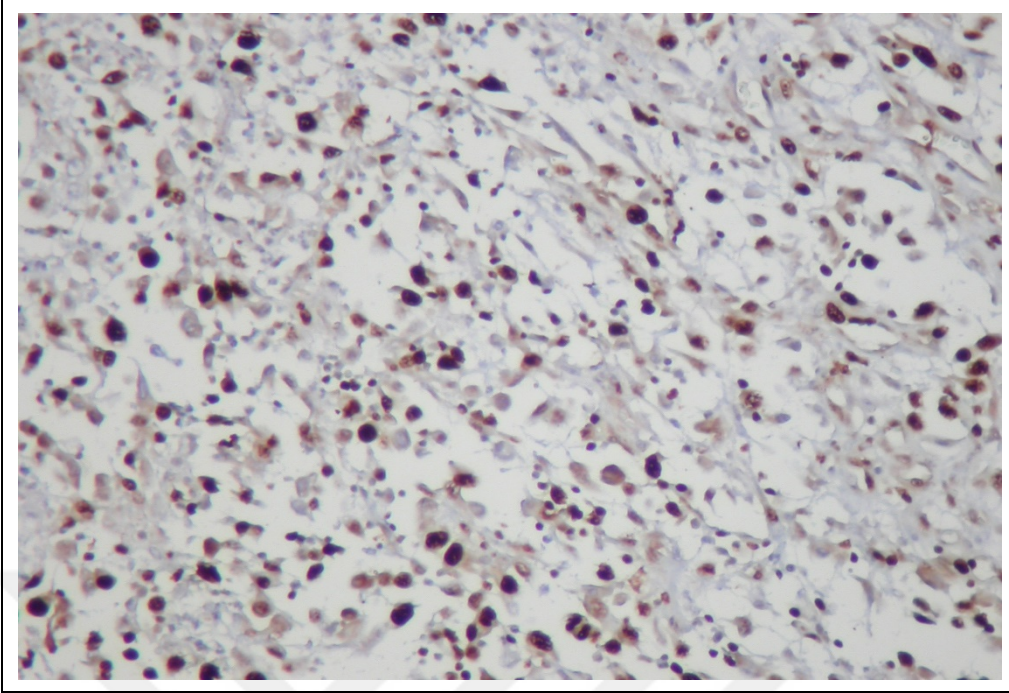
Resim 14: Modifiye Bergkvist'e göre derece IIA bir tümördeki %1 p53 pozitifliği, x100



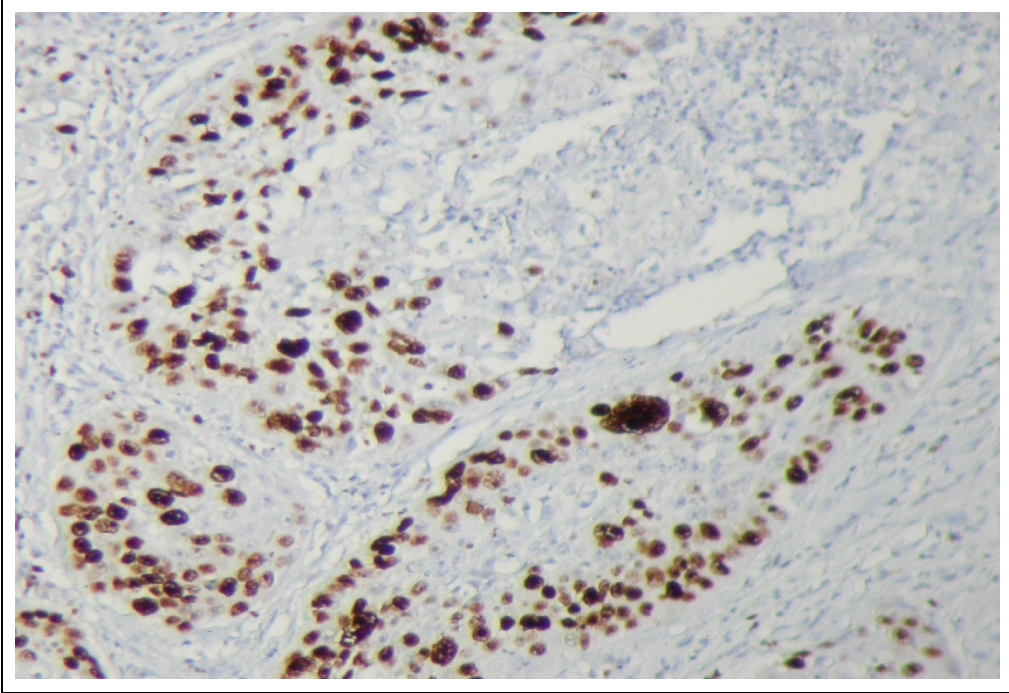
Resim56: Modifiye Bergkvist'e göre derece III bir tümördeki %99 p53 pozitifliği,
x200



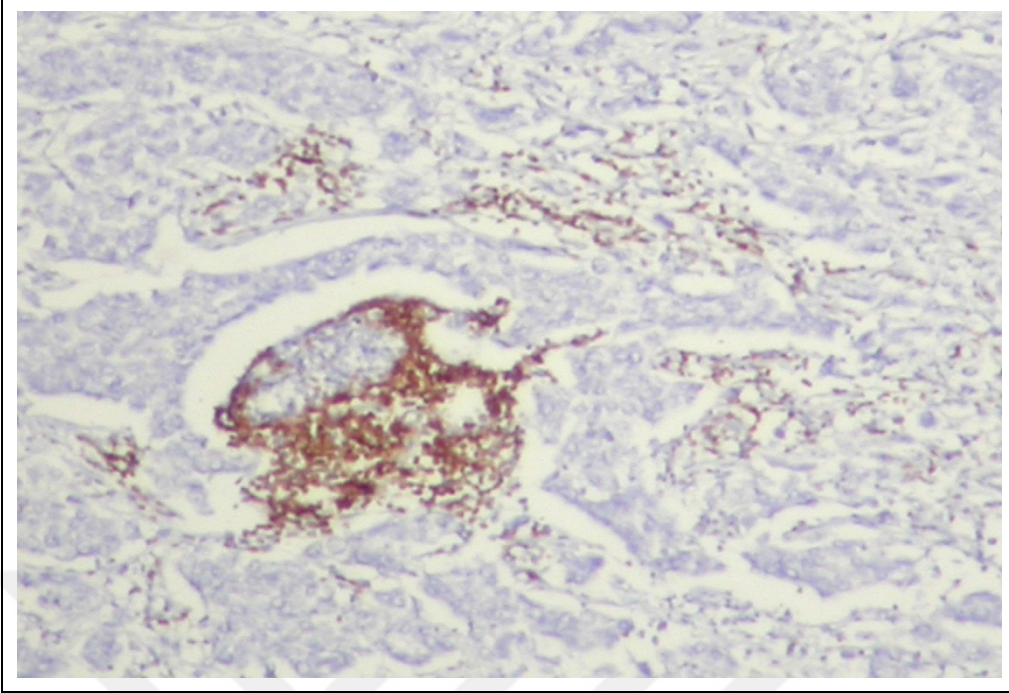
Resim 16: Modifiye Bergkvist'e göre derece IIA bir tümördeki <%10 Ki-67 pozitifliği,
x100



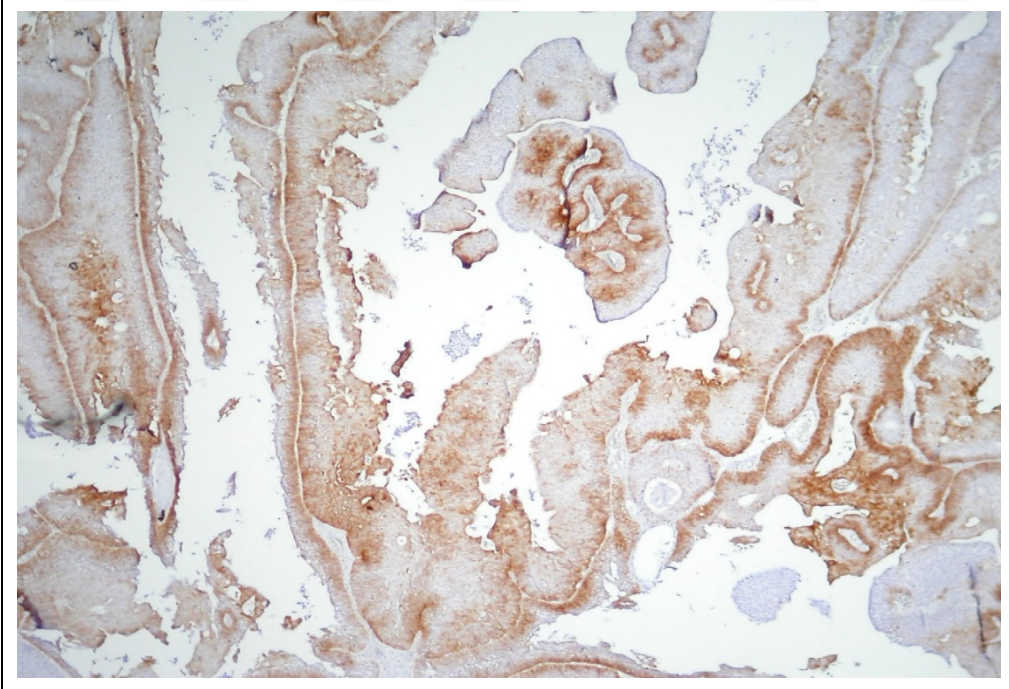
Resim17: Modifiye Bergkvist'e göre derece IV bir tümördeki %97 Ki-67 pozitifliği, x200



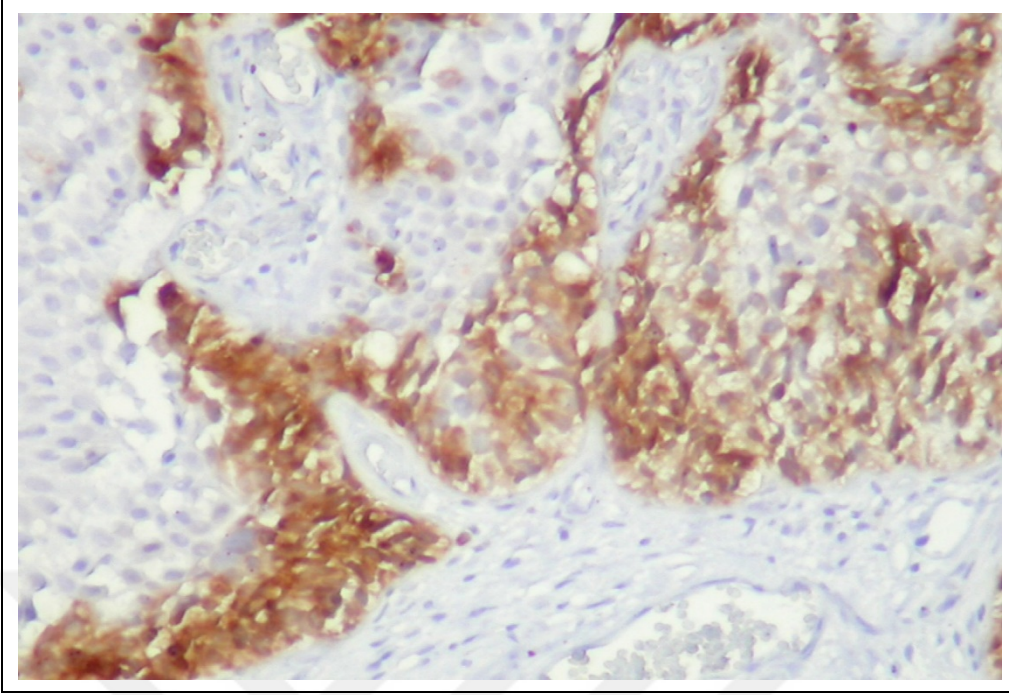
Resim18: Evre T3 bir tümördeki yüksek Ki-67 pozitifliği, x200



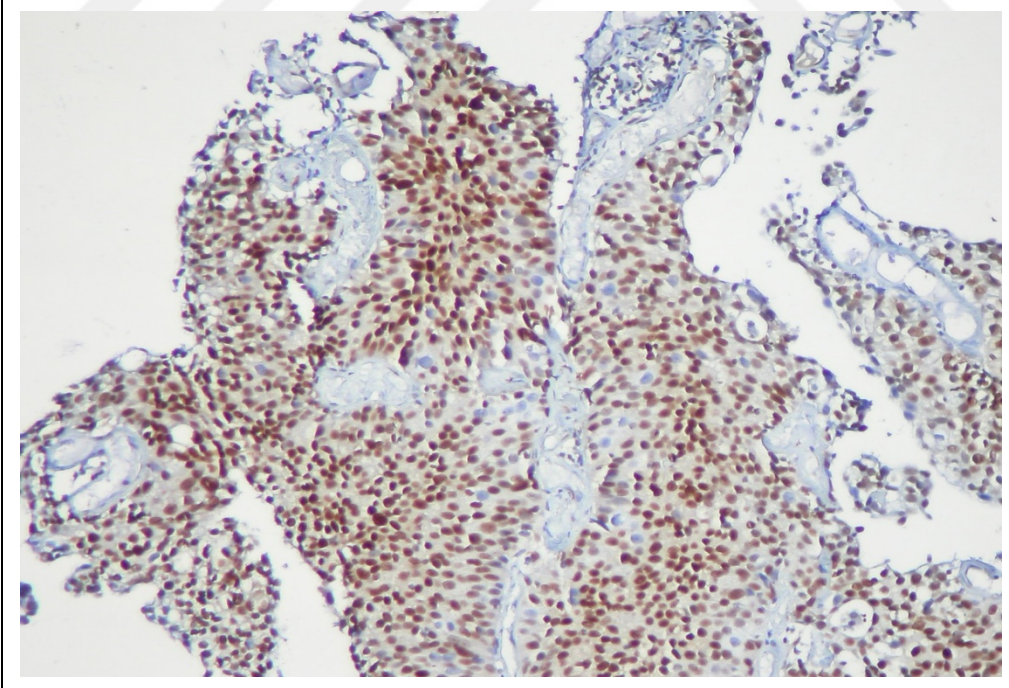
Resim 19: *bcl-2* boyanma skoru 0 olan bir DEK, iç kontrol olarak kullanılan lenfositler boyanmış. x200



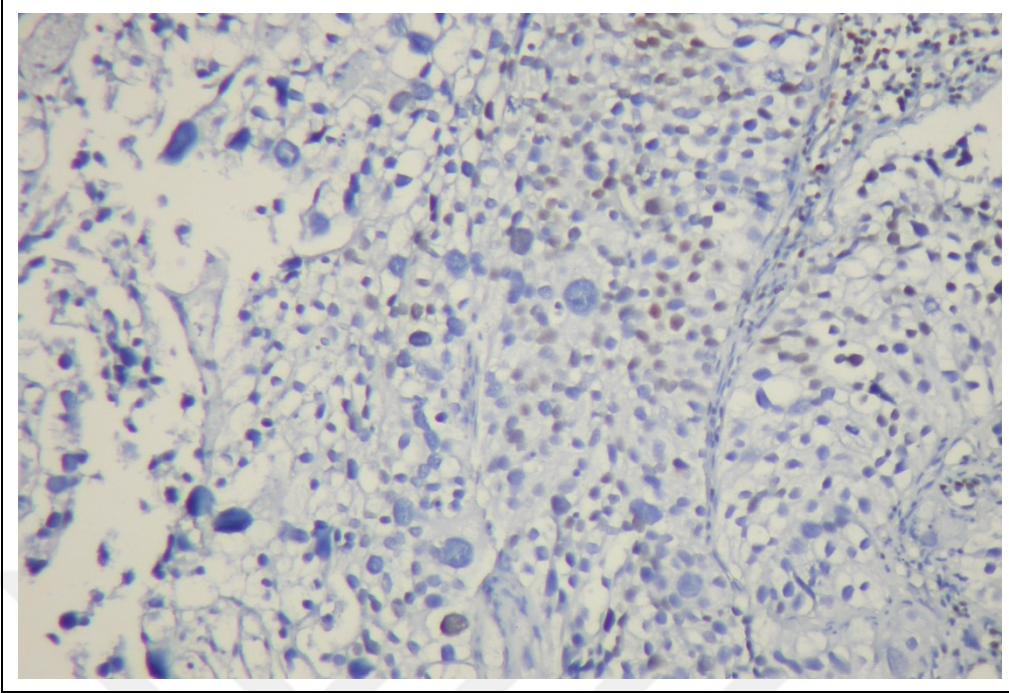
Resim 20: *bcl-2* boyanma skoru 3 olan bir DEK, x40



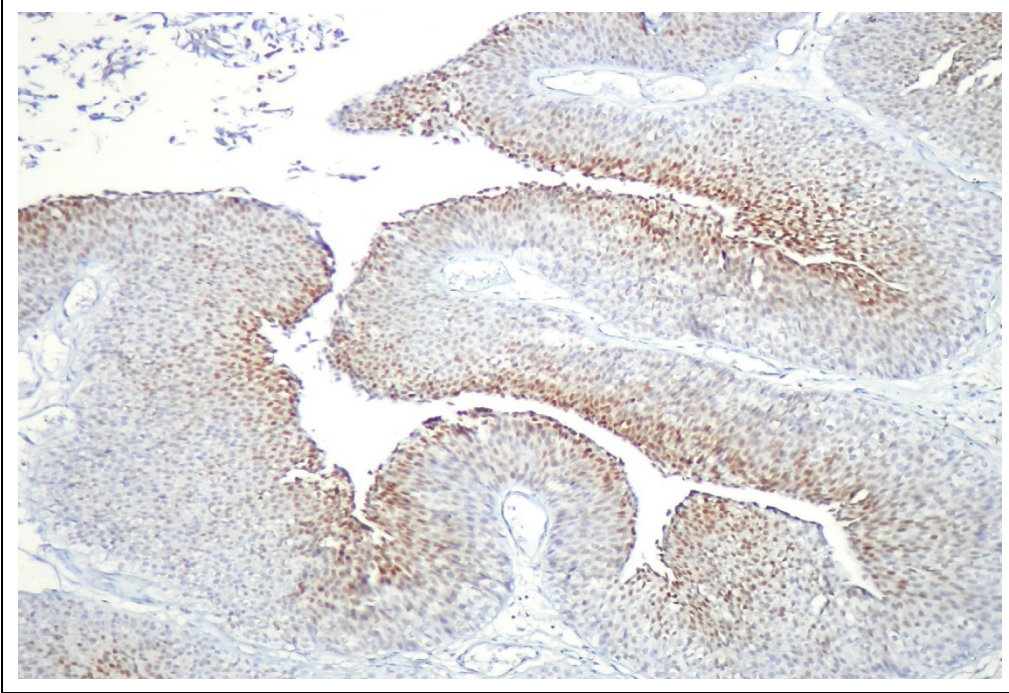
Resim 21: Resim 20'deki tümörün büyük büyütmedeki görünümü, x200



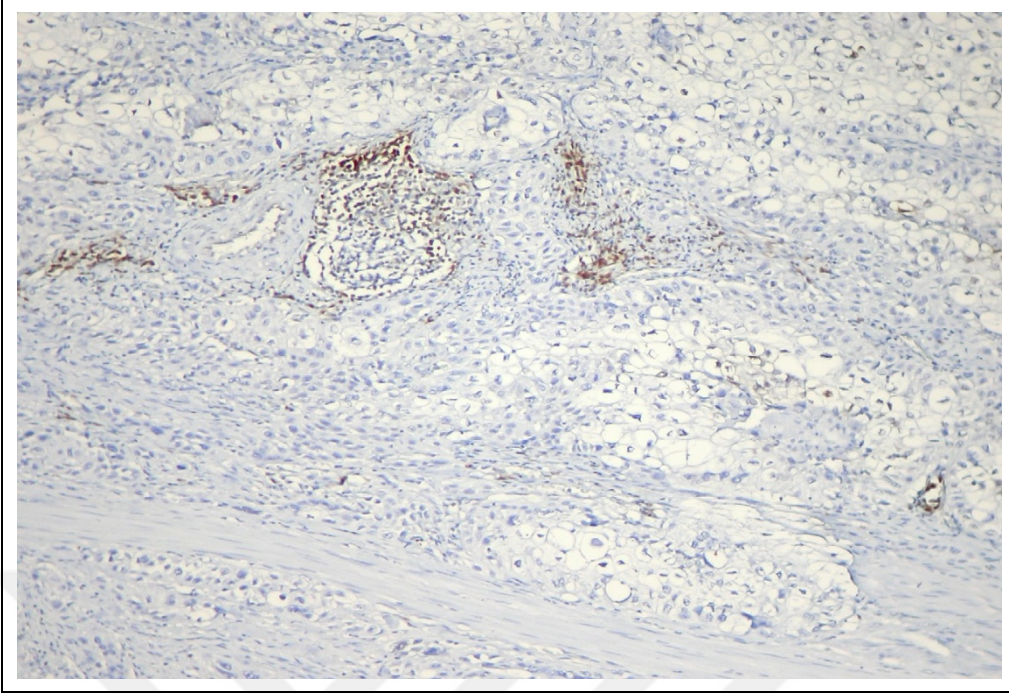
Resim 22: Modifiye Bergkvist'e göre derece IIA bir tümördeki %80 p27^{Kip1} pozitifliği, x100



Resim 23: Modifiye Bergkvist'e göre derece III bir tümördeki <math>< 5\%</math> p27^{Kip1} pozitifliği, x200



Resim 24: Noninvaziv bir DEK'de papillaların süperfisyel hücrelerindeki yüksek p27^{Kip1} pozitifliği, x40



Resim 25: İnvaziv bir DEK'teki p27^{Kip1} ekspresyon kaybı, iç kontrol olarak kullanılan lenfositler boyanmış. x100

TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Mesaneinin değişici epitel karsinomu (DEK) genitoüriner sistemin sık bir malignitesidir. Sağaltım yaklaşımının belirlenmesinde biyolojik potansiyelinin doğru değerlendirilmesinin önemi büyüktür. Patolojik evre ve derece bu potansiyeli belirleyen temel prognostik faktörlerdir (2-4). DEK için kabul edilen evreleme sistemi, American Joint Cancer Committee (AJCC) ve International Union Against Cancer (UICC) tarafından da önerilen Tümör-Nod-Metastaz (TNM) sistemidir (22,23). Broders ve ark.'a ait ilk derecelendirme sisteminden (10) bu yana önerilmiş pekçok derecelendirme sistemi üzerinde ise tam bir fikir birliğine varılamamıştır. Her merkez kendi benimsediği bir ya da birkaç derecelendirme sistemini kullanmakta bu da farklı merkezler arasında iletişim sorunlarına yol açmaktadır. Üstelik prognozu öngörmekte hangi derecelendirme sisteminin daha üstün olduğu konusunda kafalarda soru işareti vardır. Carbin ve ark. 124 DEK olgusu ile yaptıkları bir çalışmada WHO 1973 derecelendirme sistemi ile modifiye Bergkvist derecelendirme sistemini karşılaştırmışlar ve özellikle derece II tümörlü olguların yaşam süresini öngörmekte WHO 1973'ün yetersiz kaldığını saptamışlardır (20). Bildiğimiz kadarıyla Modifiye Bergkvist, Murphy ve WHO/ISUP 1998 derecelendirme sistemlerini karşılaştıran bir çalışma yoktur. Çalışmamızda bu derecelendirme sistemleri ile LP, MP invazyonu ve prognoz arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p<0,01$). Ancak modifiye Bergkvist derecelendirme sistemi ile nüks süresi arasında anlamlı negatif korelasyon görülmüş ($p<0,05$) ve bu derecelendirme sistemi diğer derecelendirme sistemlerine göre nüks süresini öngörmekte daha üstün bulunmuştur.

Yine de aynı derece tümörler arasında bile farklı davranış modellerinin bulunabilmesi prognozla ilişkili başka faktörlerin de bulunduğunu düşündürmekte ve

yeni belirleyicilere gereksinim duyulmaktadır. Bu amaçla yapılan araştırmalarda özellikle hücre proliferasyonunun düzenlenmesi ile ilgili moleküler belirleyiciler üzerinde durulmaktadır.

p53

Hücrelerde fizyolojik koşullarda az miktarda p53 proteini bulunur ancak hücre mutajenik ajanlarla karşılaştığında DNA hasarı gelişir ve p53 proteini stabil hale gelir; DNA'ya bağlanarak hücre siklusunun G₁ fazını durdurur (26,27,32). Bu duraklama, hasarlı DNA'nın onarımı için hücreye zaman kazandırır. Eğer onarım sağlanamazsa, p53 apoptozis yoluyla hücreyi ölüme götürür. Mutasyona uğramış ya da inaktive olmuş p53 içeren hücrelerde ise bölünme sırasında duraklama ya da apoptozis geręekleşmeyeceęi için hasarlı DNA replikasyona uğrar, mutasyon kalıcı hale gelir. p53'ün fonksiyon kaybı, diğer mutasyonlara da predispozisyon sağlar ve sonuçta malign klonlar üretilir (27,29). Mutasyonlar dışında, bazı DNA virüslerinin transforme edici proteinleri ile bazı onkogenlerin ürünleri de normal p53'e bağlanarak inaktivasyon sağlarlar (27).

p53 mutasyonlarının insanlarda görülen tümörlerdeki dağılımını ve prognostik önemini belirlemeye yönelik çok sayıda çalışma yapılmış ve normal p53'ün tümör süpresör fonksiyonunun kaybı ile tümörün radyoterapiye ve kemoterapiye direnç kazanması ya da kötü prognozlu olması arasında ilişki saptanmıştır (25,26,33). p53 mutasyonlarının bazı tümörlerde bağımsız bir prognostik faktör olduğundan da söz edilmektedir (29).

DEK'lerde de p53 ekspresyonu ile histolojik derece ve evre arasında pozitif korelasyon olduğunu bildiren yayınlar bulunmaktadır (25,36,64). Çalışmamızda da p53 ekspresyonu ile ilgili olarak Modifiye Berkvist derecelendirme sistemine göre derece IIA tümörlerle derece III tümörler arasındaki boyanma farkının ($p < 0,01$). Murphy ve WHO/ISUP derecelendirme sistemlerine göre ise düşük ve yüksek dereceli tümörler arasındaki boyanma farkının anlamlı olduğu saptanmıştır (her ikisi de $p < 0,05$). Ancak p53 boyanma oranı T3 tümörlerde oldukça yüksek olmakla p53 ile evre arasında herhangi bir ilişki gözlenmemiştir.

Gontero ve ark. p53 ve Ki-67'nin nüksle ilişkili olduğunu saptamışlardır (25). Nükleer p53 birikiminin nüks ve progresyon riskini arttırdığı ve yaşam süresini azalttığını savunanlar da vardır (25,37,64). Esrig ve ark. 253 radikal sistektomi materyali ile yaptıkları retrospektif bir çalışmada p53'ün T1, T2 ve T3 tümörlü

hastalarda nüks ve yaşam süresi için bağımsız bir prognostik faktör olduğunu göstermişlerdir (35). Bu sonucu destekleyen başkaları da olmakla birlikte (36-39); p53'ün herhangi bir prognostik değerinin olmadığını savunanlar da vardır (Tablo 23) (26,40,41).

Tablo 23: DEK'te p53'ün Prognostik Değeri İle İlgili Son 10 Yıla Ait Çalışmalar

| Çalışma | Yıl | Sayı | Evre | Eşik Değeri | p53'ün Prognostik Değeri |
|------------|------|------|-------------|-------------|---|
| Sarkis | 1993 | 54 | TA | 20 | Var (yaş, cins, derece ve BCG'den bağımsız) |
| Thomas | 1993 | 21 | T1 | 10 | Yok |
| Lipponen | 1993 | 212 | TA-T4 | 20 | Yok |
| Sarkis | 1994 | 33 | CIS | 20 | Var (yaş, cins ve BCG'den bağımsız) |
| Esrig | 1994 | 243 | TA-T4 | 10 | Var (derece, evre ve lenf nodundan bağımsız) |
| Lipponen | 1994 | 23 | TA-T4 | 20 | Yok |
| Gardiner | 1994 | 28 | T1 | 10 | Yok |
| Serth | 1995 | 69 | T1 | 20 | Var (yaş, cins ve dereceden bağımsız) |
| Nakopoulou | 1995 | 97 | TA-T4 | 10 | Yok |
| Lacombe | 1996 | 98 | TA, Tis, T1 | 20 | Var (BCG öncesi evre ve p53'ten, BCG yanıtından bağımsız) |
| Underwood | 1996 | 106 | TA-T4 | | Yok |

| | | | | | |
|-------------------|----------|-----|------------------|-----|---|
| Tetu | 199 6 | 265 | TA-T1 | 0 | Yok |
| Vet | 199 6 | 26 | | | +/- |
| Casetta | 199 7 | 59 | TA | 0,5 | Var (tümör büyüklüğü ve nüksten bağımsız) |
| Çalışkan | 199 7 | 30 | TA-T1 | 0 | Yok |
| Cordon-Cardo | 199 7 | 59 | TA-T1 | 20 | Yok |
| Raitanen | 199 7 | 51 | TA-T4 | 20 | Yok |
| Lee | 199 7 | 32 | T1 G2-G3 /BCG | | Var |
| Schmitz Drager | 199 7 | 92 | TA,T1- T4,CIS | | Var |
| Popov | 199 7 | 114 | TA-T4 | | Var |
| Ovesen | 199 7 | 60 | CIS/BCG | 20 | Tedaviden sonra p53 pozitifse var |
| Tzai | 199 8 | 100 | TA,T1 | | Yok |
| Abdel- Fattah | 199 8 | 54 | TA-T4 | 50 | Yok |
| Grosmann | 199 8 | 45 | T1 | 10 | Var |
| Pages | 199 8 | 43 | T1/BCG | 10 | Yok |

| | | | | | |
|------------|------|-----|-------------------|----|---------------------------------|
| Lebret | 1998 | 35 | T1 G3/BCG | | Yok |
| Nakopoulos | 1998 | 106 | TA,T1,CIS | | Var, bağımsız prognostik faktör |
| Pfister | 1998 | 83 | TA-T4 | 10 | Yok |
| Zlotta | 1999 | 47 | TA,T1,CIS/ BCG | 10 | Yok |
| Malmstrom | 1999 | 261 | TA,T1,CIS | | Var |
| Pfister | 1999 | 60 | TA-T2 | | Var |

Çalışmamızda p53 ile nüks arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. İzlem süreleri 24 ay veya daha fazla olan olgularla (n=32) ölen olgular (n=13) ayrı ayrı gruplandırıldığında da gruplar arasında p53 boyanma oranları açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Çok az sayıda olgumuzda histolojik derece ya da invazyon progresyonu izlendiği için progresyon gösteren olgularla progresyon göstermeyen olgular arasındaki boyanma oranları karşılaştırılamamıştır.

Literatürdeki ve literatürle bazı sonuçlarımız arasındaki bu uyumsuzluk 2002 yılında Schmitz-Drager ve ark. DEK'te p53'ün prognoz ile ilişkisini inceleyen tüm literatürü tarayarak yaptıkları bir derlemede de (138 yayın/3764 olgu) belirttikleri gibi büyük bir olasılıkla hasta grubu/antikör seçimi, eşik değerleri, yöntem gibi teknik ve klinik değerlendirme farklılıklarından kaynaklanmaktadır (25).

Bu bulgularla p53'ün prognostik değerini belirlemede retrospektif çalışmalardan çok belli bir standardizasyonu olan prospektif çalışmaların daha yararlı olacağına inanılmıştır

Ki-67

Siklusa giren hücrelerin G₁ fazında artarak geç G₁, S, G₂ ve M fazlarında ekspres edilen (25,26,42-44) Ki-67 nükleer antijenine karşı geliştirilmiş monoklonal ve poliklonal antikörler tümörlerin proliferasyon aktivitesini belirlemek için kullanılır (43).

Bu indeksi yüksek olan tümörler genel olarak daha agresif seyrederler. Meme, tiroid karsinomları, lenfomalar gibi birçok tümörde Ki-67'nin immünohistokimyasal pozitiflik oranıyla tümörün histolojik derecesi arasında önemli bir ilişki saptanmıştır (27).

Mesane DEK olgularında da Ki-67 ekspresyonu ile histolojik derece ve evre arasında pozitif korelasyon bildiren çalışmalar yayınlanmıştır (26,43-49,79). Çalışmamızda Ki-67 indeksi ile derecelendirme sistemlerinin tümüne göre olguların dereceleri arasında anlamlı bir ilişki olduğu ($p<0,01$) ve Ki-67 boyanma oranının derece yükseldikçe arttığı görülmüştür. Ayrıca Ki-67'nin tüm derecelendirme sistemleri için dereceyi öngörmeye bağımsız bir değişken olduğu belirlenmiştir. TA tümörler ile T2 tümörler ve yine TA tümörler ile T3 tümörler arasındaki farkların da istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Buradan yüksek Ki-67 oranının tümörün derine invazyonunu öngörmeye yardımcı olabileceği düşünülmüştür.

Suwa ve ark. 75 DEK ile yaptıkları bir çalışmada univariate ve multivariate sağkalım analizlerinde Ki-67'nin bağımsız bir prognostik faktör olduğunu göstermişlerdir. Masuda ve ark. da renal pelvis ve üreter DEK'leri ile ilgili çalışmalarında aynı sonuca ulaşmışlardır (47). Çalışmamızda da izlem süreleri 24 ay veya daha fazla olan olgularla ($n=32$) ölen olgular ($n=13$) ayrı ayrı gruplandırıldığında gruplar arasında Ki-67 boyanma oranları açısından anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Ki-67 ekspresyonunun –ek BCG sağaltımı alınmış olsa bile– nüks, nüks süresi ve progresyon oranı ile korele olduğunu ve Ki-67'nin nüks ve progresyonu belirlemede bağımsız bir prognostik faktör olarak kullanılabileceğini bildiren çok sayıda yayın vardır (25,26,39,49,50,62). Pfister ve ark. göre ise Ki-67'nin nüksü değil, nüks süresini öngörmeye bağımsız bir prognostik faktördür (48). 207 DEK ile yapılan başka bir çalışmada tümör derecesinin nüksü belirleyen tek bağımsız prognostik faktör olduğu; Ki-67'nin yalnızca progresyonu öngörmeye kullanılabileceğini savunulmuştur (25). Çalışmamızda da Ki-67 ile nüks arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Az sayıda olguda histolojik derece ya da invazyon progresyonu izlendiği için progresyon gösteren olgularla progresyon göstermeyen olgular arasındaki boyanma oranları karşılaştırılamamıştır.

Bazı yayınlarda p53 ile Ki-67 arasında da bir korelasyon olduğundan söz edilmektedir (26). Bizim çalışmamızda da p53 ile Ki-67 arasında anlamlı ($p<0,05$) pozitif korelasyon saptanmıştır.

bcl-2

Foliküler lenfomalar için tanısal belirleyici kabul edilen ve diğer pekçok hemopoetik neoplazmda da izlenen bcl-2 immünreaktivitesi çeşitli tümör grupları ile ilgili çalışmalara da konu olmuş ve iyi diferansiye meme ve kolon karsinomlarında kötü diferansiye tiplerden daha yüksek oranda saptanmıştır (27). Normal mesane mukozasının bazal hücrelerinde bcl-2 ekspresyonu olduğu bilinmekle birlikte literatürde DEK'lerde bcl-2 immünreaktivitesi ile ilgili az sayıda çalışma olduğu ve bu çalışmaların sonuçları arasında bir tutarlılık bulunmadığı görülmektedir. Nakopoulou ve ark. bcl-2 ile derece ve evre arasında anlamlı negatif korelasyon olduğunu (77); başka bazı yazarlar ise böyle bir korelasyon saptamadıklarını bildirmişlerdir (61, 62, 78). Vollmer ve ark. da bcl-2 ekspresyonunun –özellikle p53 mutasyonu yokluğunda– tümörün invazyonunu engellediğini savunmuşlardır. Çalışmamızda bcl-2 ile herhangi bir derecelendirme sistemine göre verilen derece arasında anlamlı bir ilişki olmamasına karşın bcl-2 ile evre arasında anlamlı negatif korelasyon ($p<0,05$) izlenmiştir.

Kirsh ve ark. bcl-2 ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (61). Kombine p53/bcl-2 pozitifliğinin prognozu öngörmede daha değerli olup olmadığı ile ilgili de çelişkili yayınlar vardır: Glick ve ark. bu iki belirleyici arasındaki herhangi bir kombinasyonla prognoz arasında ilişki saptamamışlar. Nakopoulou ve ark. p53 pozitif/bcl-2 negatif tümörlerin kötü prognozlu olduklarını savunmaktadırlar. Ong ve ark. ise p53 ve bcl-2 negatif tümörlerin bu belirleyicilerden en az birisi pozitif tümörlere göre daha iyi prognozlu olduklarını ve p53 ve bcl-2 kombinasyonunun prognozu öngörmek için kullanılabileceğini öne sürmektedirler (60). Çalışmamızda bcl-2 ile prognoz ya da kombine p53/bcl-2 ile prognoz arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Tek başına bcl-2 ile olmasa da bcl-2/bax oranı ile nüks arasında güçlü bir korelasyon izlendiğini bildiren yayınlar (25,60) yanında bcl-2 ile nüks arasında herhangi bir ilişki olmadığını öne süren yayınlar da (61,62) vardır. Çalışmamızda da bcl-2 ile nüks arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Atuğ ve ark. bcl-2 pozitif tümörlerde daha fazla progresyon olduğunu öne sürmüşlerdir (61). Serimizde çok az sayıda olguda histolojik derece ya da invazyon progresyonu izlendiği için progresyon gösteren olgularla progresyon göstermeyen olgular arasındaki boyanma oranları karşılaştırılamamasına karşın bcl-2'nin apoptozisi inhibe ederek agresif biyolojik potansiyelleri olan tümör hücrelerinin yaşam sürelerini uzatabileceği ve progresyonu arttıracakı düşünülmüştür. Preoperatif radyoterapi sonrasında bcl-2 ekspresyon oranı yüksek tümörlerde progresyon görülmesinin (60,79) altında yatan etken de olasılıkla budur.

p27^{Kip1}

Özellikle son yıllarda, kanser gelişimindeki kritik aşamanın normal hücre siklusundaki bozulma olduğu anlaşılmıştır (63-67). G1 fazından S fazına geçiş en önemli kontrol noktasıdır (66,67) ve bu geçiş siklinler (3 tip siklin D ve siklin E), siklin bağımlı kinazlar (Cdk) ve Cdk inhibitörleri arasındaki etkileşimle düzenlenir (64,66).

Cdk inhibitörleri ailesi INK4 ve Cip/Kip olmak üzere iki farklı kategoriye ayrılmıştır. Birinci kategoride p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} ve p19^{INK4d}; ikinci kategoride ise p21^{waf1/cip1}, p27^{Kip1} ve p57^{Kip2} yer alır (68,69). Steeg ve Abrams geç G1 fazından S fazına geçişte özellikle p27^{Kip1}'in merkezi bir rol oynadığını saptamışlardır (70). p27^{Kip1}'in tümöre özgü mutasyonu olmamakla birlikte (63,64,71,72) çeşitli tümörlerde ekspresyonun azaldığı bildirilmiştir (63,69,71,72). Özellikle meme, akciğer, over, prostat ve kolon karsinomlarında p27^{Kip1} immünohistokimyasal boyanmasının klinik prognozla iyi korelasyon gösterdiğinden söz edilmektedir (63,69).

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda düşük p27^{Kip1} ekspresyonunun DEK olgularında da kötü diferansiye derece, kas ve lenf nodu invazyonu ile ilişkili olduğu görülmüştür (25,63,64,67,72-74). Çalışmamızda p27^{Kip1} ile modifiye Bergkvist'e göre derece arasında anlamlı bir ilişki olduğu (p<0,05) ve p27^{Kip1} boyanma oranının derece arttıkça azaldığı saptanmıştır. p27^{Kip1} ile Murphy ve WHO/ISUP'a göre derece arasında herhangi bir ilişki yoktur. p27^{Kip1} ekspresyonu ile evre arasındaki ilişkiye gelince, TA ile T2 ve T1 ile T2 olgu grupları arasındaki boyanma farkının sınırdan anlamlılık gösterdiği (p=0,057 ve p=0,046); TA ile T3 ve T1 ile T3 olgu grupları arasında ise belirgin bir fark olduğu (p<0,05 ve p<0,01) dikkati çekmiş ve p27^{Kip1} ekspresyon kaybının tümör invazyonunu arttırdığı düşünülmüştür.

Çeşitli tümörlerde olduğu gibi DEK'te de heterojen p27^{Kip1} pozitifliğinden söz edilmektedir (72,74). Çalışmamızda da %14,4 oranında heterojen boyanma görülmüştür. Özellikle invaziv tümörlerin en derin bölümlerindeki düşük boyanma oranının; p27^{Kip1} ekspresyon kaybının tümörün invazyon potansiyelini arttırdığı tezi (72) ile uyumlu olduğu düşünülmüştür. Meme karsinomlarında E-cadherin'in aşırı ekspresyonunun p27^{Kip1} düzeyini arttırdığı ve bunun da hücre proliferasyonunu ve invazyon potansiyelini azalttığı kanıtlanmıştır (72). Dahası Thomas ve ark., kolorektal karsinom metastazlarında primer tümöre göre p27^{Kip1} ekspresyonunda azalma saptamışlardır (80). Bu bulgular p27^{Kip1} ekspresyon kaybının tümöral hücrelerin yaşam sürelerini arttırdığını ve tümör hücrelerine invazyon ve metastaz için fırsat yarattığı düşüncesini desteklemektedir.

Lessard ve ark. 172 DEK ile yaptıkları bir çalışmada p27^{Kip1} ekspresyonu ile ölüm oranı arasında anlamlı negatif korelasyon ($p < 0,05$) bildirmişlerdir (81). p27^{Kip1} ekspresyonunun bağımsız bir prognostik faktör olarak kullanılabileceğini savunanlar da vardır (63,64,75). Başka bazı çalışmalarda ise p27^{Kip1}'in herhangi bir prognostik önemi olmadığı öne sürülmektedir (68,69). Çalışmamızda izlem süreleri 24 ay veya daha fazla olan olgularla ($n=32$) ölen olgular ($n=13$) ayrı ayrı gruplandırıldığında; gruplar arasında p27^{Kip1} boyanma oranları açısından anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p < 0,01$).

Lenfomalarda ve beyin tümörlerinde Ki-67 ve p27^{Kip1} pozitifliği arasında güçlü ters orantı izlenmesine rağmen epitelyal tümörde hücre proliferasyonu ile p27^{Kip1} arasında bir korelasyon olup olmadığı net değildir (82). Ancak Kamai ve ark. DEK'te de Ki-67 ve p27^{Kip1} arasında negatif korelasyon saptamışlar ayrıca Ki-67 indeksi yüksek olgulardan p27^{Kip1} ekspresyonu da yüksek olanların, p27^{Kip1} ekspresyonu düşük olanlara göre daha iyi prognozlu olduklarını bildirmişlerdir. Korkolopoulou ve ark. göre de kombine Ki-67/p27^{Kip1} yaşam süresini öngörmede tek başına Ki-67 veya p27^{Kip1}'e göre daha üstündür (50). Çalışmamızda Ki-67 ve p27^{Kip1} arasında anlamlılık sınırında ($p=0,057$) negatif korelasyon görülmüştür. Bildiğimiz kadarıyla DEK'lerde bcl-2 ve p27^{Kip1}'in birlikte değerlendirildiği bir çalışma yoktur. Çalışmamızda bcl-2 ve p27^{Kip1} arasında anlamlı pozitif korelasyon ($p < 0,01$) izlenmiştir.

Düşük p27^{Kip1} (63,72,74) ya da kombine yüksek Ki-67/düşük p27^{Kip1} (65,74) ekspresyonunun nüks için iyi bir belirleyici olduğunu bildiren yayınlar olmasına

rağmen çalışmamızda p27^{Kip1} ya da kombine yüksek Ki-67/düşük p27^{Kip1} ile nüks arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

p27^{Kip1} oranı yüksek tümörlerde progresyon gelişmediği ve bu bulgunun düşük p27^{Kip1} ekspresyonunun tümör hücrelerinin agresif transformasyonu ile ilişkili olabileceğini düşündüğü bildirilmiştir (63). Primdahl ve ark. da primer invaziv DEK'lerdeki p27^{Kip1} ekspresyon oranının, sekonder invaziv tümörlerdeki (önceki süperfisial bir tümörden gelişmiş invaziv tümör) ekspresyon oranına göre daha düşük olduğunu ve bunun primer invaziv tümörlerde supresör hücre siklus düzenleyicilerinin daha fazla kaybedildiği düşüncesini desteklediğini savunmaktadırlar. Ancak çalışmamızda çok az sayıda olguda histolojik derece ya da invazyon progresyonu izlendiği için progresyon gösteren olgularla progresyon göstermeyen olgular arasındaki boyanma oranları karşılaştırılamamıştır.

Tüm bu bulguların ışığında modifiye Bergkvist derecelendirme sisteminin daha fazla subgrup içerdiği için nüksü ve nüks süresini öngörmeye diğer derecelendirme sistemlerine göre daha üstün olduğu düşünülmüştür. p53 ile ilgili olarak literatürdeki ve literatürle bazı sonuçlarımız arasındaki çelişkilerin olasılıkla hasta grubu/antikor seçimi, eşik değerleri, yöntem gibi teknik ve klinik değerlendirme farklılıklardan kaynaklandığına ve p53'ün prognostik değerini belirlemede belli bir standardizasyonu olan prospektif çalışmaların daha yararlı olacağına inanılmıştır. Ayrıca bcl-2 ile prognoz arasında herhangi bir ilişki olmamasına rağmen Ki-67 ve p27^{Kip1}'in prognostik değerleri olduğu; özellikle Ki-67'nin tüm derecelendirme sistemleri için dereceyi öngörmeye bağımsız bir değişken olarak kullanılabileceği görülmüştür.

ÖZET

DEK'in tedavi yaklaşımının belirlenmesinde biyolojik potansiyelinin doğru değerlendirilmesinin önemi büyüktür. Patolojik evre ve derece bu potansiyeli belirleyen temel prognostik faktörler olmakla birlikte aynı evre ve aynı derece tümörler arasında bile farklı davranış modellerinin bulunması ilişkili başka faktörlerin de bulunduğunu düşündürmekte ve yeni belirleyicilere gereksinim duyulmaktadır.

Bu amaçla planlanan çalışmamızda 78 olguya ait, 97 TUR ve 14 radikal sistoprostatektomi materyalinden elde edilen 111 DEK, histolojik derece, LP, MP invazyonu ve evre yanı sıra immunohistokimyasal olarak da p53, Ki-67, Bcl-2 ve p27^{Kip1} ekspresyonu açısından değerlendirilmiştir. Olgular nüks (gelişim, süre, nükslerde histolojik derece ve invazyon progresyonu) ve ölüm (yaşıyor/öldü, ölüm süresi) açısından da ayrıca incelenmiştir.

Tüm derecelendirme sistemleri ile LP, MP invazyonu ve ölüm arasında anlamlı bir ilişki saptanmış ($p<0,01$); modifiye Bergkvist derecelendirme sistemi ile nüks süresi arasında da anlamlı negatif korelasyon görülmüştür ($p<0,05$).

p53 ekspresyonu ile ilgili olarak Modifiye Berkvist derecelendirme sistemine göre yalnızca derece IIA tümörlerle derece III tümörler arasındaki boyanma farkının ($p<0,01$); Murphy ve WHO/ISUP derecelendirme sistemlerine göre ise düşük ve yüksek dereceli tümörler arasındaki boyanma farkının anlamlı olduğu görülmüştür (her ikisi de $p<0,05$). Ki-67 ekspresyonu ile tüm derecelendirme sistemlerine göre derece arasında anlamlı pozitif korelasyon saptanmış ($p<0,01$); ayrıca Ki-67'nin tüm derecelendirme sistemleri için dereceyi öngörmede bağımsız bir değişken olduğu

belirlenmiştir. bcl-2 ile herhangi bir derecelendirme sistemine göre derece arasında ise anlamlı bir ilişki yoktur. p27^{Kip1} ile modifiye Bergkvist'e göre derece arasında anlamlı bir ilişki olduğu ($p<0,05$) ve p27^{Kip1} boyanma oranının derece arttıkça azaldığı görülmüştür.

p53 boyanma oranı T3 tümörlerde oldukça yüksek olmakla birlikte p53 ile evre arasında herhangi bir ilişki yoktur. Ki-67 ile evre arasında da paralellik olduğu ve Ki-67 boyanma oranının evre arttıkça arttığı görülmekle birlikte yalnızca TA tümörler ile T2 tümörler ve yine TA tümörler ile T3 tümörler arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (her ikisi de $p<0,05$). bcl-2 ile evre arasında ise anlamlı negatif korelasyon ($p<0,05$) saptanmıştır. p27^{Kip1} ile ilgili olarak TA ile T2 ve T1 ile T2 olgu grupları arasındaki boyanma farkının sınırda anlamlılık gösterdiği ($p=0,057$ ve $p=0,046$), TA ile T3; T1 ile T3 olgu grupları arasında ise belirgin bir fark olduğu ($p<0,05$ ve $p=0,01$) dikkati çekmiştir.

İmmünohistokimyasal belirleyiciler birbirleriyle karşılaştırıldığında p53 ve Ki-67 arasında ve bcl-2 ile p27^{Kip1} arasında anlamlı pozitif korelasyon ($p<0,05$ ve $p<0,01$). dikkati çekmiş; Ki-67 ve p27^{Kip1} arasında ise anlamlılık sınırında ($p=0,057$) negatif korelasyon saptanmıştır.

Çok az sayıda olguda histolojik derece ya da invazyon progresyonu izlendiği için progresyon gösteren olgularla progresyon göstermeyen olgular arasındaki boyanma oranları karşılaştırılamamıştır.

İzlem süreleri 24 ay veya daha fazla olan olgularla ($n=32$) ölen olgular ($n=13$) ayrı ayrı gruplandırıldığında ise gruplar arasında Ki-67 ve p27^{Kip1} boyanma oranları açısından anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p<0,05$ ve $p<0,01$).

Tüm bu bulguların ışığında modifiye Bergkvist derecelendirme sisteminin daha fazla subgrup içerdiği için nüksü ve nüks süresini öngörmeye diğer derecelendirme sistemlerine göre daha üstün olduğu düşünülmüştür. Ayrıca Ki-67 ve p27^{Kip1}'in de prognostik değerleri olduğu; özellikle Ki-67'nin tüm derecelendirme sistemleri için dereceyi öngörmeye bağımsız bir değişken olarak kullanılabileceği görülmüştür.

SUMMARY

Relations of p53, Ki-67, bcl-2 and p27^{Kip1} Expressions with Grading Systems and Prognosis in Transitional Cell Carcinomas of the Bladder

Determining biological potential of transitional cell carcinomas of the bladder is important in therapeutical approach. Cases having tumors with the same stage and grade may have different behaviors though the pathological stage and grade of the tumor are main prognostic factors. So, there should be additional factors affecting the prognosis and therefore, new markers are required. With this in mind, we have planned the study involving 78 cases which included 97 TUR and 14 radical cystectomy materials with a total of 111. These materials were evaluated in terms of histological grade, invasion of LP and MP and immunohistochemical characteristics which contained p53, Ki-67, bcl-2 and p27^{Kip1} expressions. In addition, cases were also documented with regard to recurrence (time of recurrence, histological grade and progression) and the status of the patient (living, exitus and if so, duration of survival).

All grading systems were found to be correlated with invasion LP and MP and status of the patient (exitus) ($p < 0,01$), though modified Bergkvist system also had significant negative correlation with recurrence ($p < 0,05$).

As for the p53 expression; according the modified Bergkvist system only grade IIA tumors showed significant staining difference with grade III tumors ($p < 0,01$) whereas low grade and high grade tumors according the Murphy and WHO/ISUP systems had significant differed in this respect (both $p < 0,05$). On the other hand, Ki-67 index is found to be independent prognostic factor in predicting the grade of the tumor while bcl-2 staining had no apparent relation with any grading

system. p27^{Kip1} expression, however, significantly correlated with modified Bergkvist system ($p < 0,05$) negatively, staining increased with decreasing grade.

Though the staining with p53 was very high in T3 tumors, statistically, there seemed to be no relationship with the stage of the case. Similarly, it could be seen that high Ki-67 indices were associated with higher stages. But only TA tumors differed significantly with T2 and T3 tumors (both $p < 0,05$). Bcl-2 had negative statistical correlation with the stage ($p < 0,05$). As to p27^{Kip1}, staining decreased with increasing stage. The groups TA versus T2 as well as T1 versus T2 had borderline significance of differences ($p = 0,057$ and $p = 0,046$ respectively) whereas TA versus T3 and T1 versus T3 had significantly differed ($p < 0,05$ and $p = 0,01$ respectively).

When immunohistochemical markers compared with each other, the pairs p53 vs Ki-67 and bcl-2 vs p27^{Kip1} showed significant positive correlation ($p < 0,05$ and $p < 0,01$). On the other hand, Ki-67 correlated negatively with p27^{Kip1} having borderline significance ($p = 0,057$).

Due to the fact that we had few documented and followed cases with progression we have not been able to compare them with unprogressed cases in terms of staining properties.

When the cases having a 24-month or more follow-up periods ($n = 32$) compared with the cases who had died of disease ($n = 13$), Ki-67 and p27^{Kip1} staining rates were found to be significantly different between the groups ($p < 0,05$ and $p < 0,01$, respectively).

It follows that modified Bergkvist system seems to be superior to others with regard to predict recurrence and its time probably due to having more subgroups in its classification system. Moreover, it was found that Ki-67 and p27 staining results can give invaluable information about the prognosis in a given case and Ki-67, particularly, proved to be independent factor in determining the grade of the tumor.

KAYNAKLAR

- 1) Reuter VE. Urinary bladder, Ureter, And Renal Pelvis. In: Sternberg SS, editor. Histology for Pathologists. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997. p. 835-47.
- 2) Reuter VE, Melamed MR. The Urotelial Tract: Renal Pelvis, Ureter, Urinary Bladder, and Urethra. In: Sternberg SS, editor. Diagnostic Surgical Pathology. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams& Wilkins; 1999. p. 1853-89.
- 3) Bostwick DG, Amin MB. Lower Urinary Tract. In: Damjanov I, Linder J. Anderson's Pathology. 10th ed. Missouri: Mosby-Year Book, Inc.; 1996. p. 2147-65.
- 4) Rosai J. Urinary Tract. In: Rosai J, editor. Ackerman's Surgical Pathology. 8th ed. Missouri: Mosby-Year Book, Inc.; 1996. p. 1185-1219.
- 5) Murphy WM: Disease of the Urinary Bladder,Urethra, Ureters, and, Renal Pelves. In: Murphy WM, editor. Urological Pathology. Philadelphia: WB Saunders; 1989 . p. 64-96
- 6) Murphy WM, Beckwith JB, Farrow GM. Tumors of the Kidney, Bladder and Related Urinary Structures. In: Atlas of Tumor Pathology, Fascicle 13, 3rd series. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1994: 193-297
- 7) Auerbach O,Garfinkel L. Histologic changes in the urinary bladder in relation to cigarette smoking and use artificial sweeteners. Cancer 1989; 64: 983-87,
- 8) Armstrong B, Doll R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special references to dietary practises. Int J Cancer 1975; 15: 617-31
- 9) Ward AM. Glanduler metaplasia and mucin production in transitional cell carcinomas of bladder. J Clin Pathol 1971; 24: 481

- 10) Broders AC. Epithelioma of the genito-urinary organs. *Ann Surg* 1922; 75: 574
- 11) Ash JE. Epithelial 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(2nd 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) 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
- 18) Histological typing of urinary bladder tumours. International classification of tumours. World Health Organization 1999 Geneva; No: 10, 2nd ed.
- 19) 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
- 20) Carbin BE, Ekman P, Gustafson h, et al. Grading of human urothelial carcinoma based on nuclear atypia and mitotic freqency. I. Histological description. *The Journal of Urology* 1991; 145: 968-71
- 21) Bostwick DG, Mikuz G. Urothelial papillary (exophytic) neoplasms. *Virchows Arch* 2002; 441: 109-16
- 22) Beahrs OH, Henson DE, Hutter RVP, et all, editors. Manual for Staging of Cancer. 4th ed. Philadelphia: Lippincott; 1992
- 23) Hermanek P, Sobin LH, editors. TNM Classifications of Malign Tumors. 4th ed. 2nd revision. Berlin: Springer-Verlag, 1992

- 24) Neumann MP, Limas C. Transitional cell carcinomas of the urinary bladder. Effects of preoperative irradiation on morphology. *Cancer* 1986; 58: 2758-63
- 25) Kausch I, Böhle A. Molecular aspects of bladder cancer III. Prognostic markers of bladder cancer. *Eur Urol* 2002; 41: 15-29
- 26) Zlotta AR, Schulman CC. Biological markers in superficial bladder tumors and their prognostic significance. *Urologic Clinics of North America* 2000; 27(1): 179-89
- 27) Türkdoğan P. Solar keratoz ve Bowen Hastalığı'nın skuamöz hücreli karsinom gelişimindeki yerini belirlemede p53, Ki-67 ve Bcl-2'nin önemi (Tez). Manisa: Celal Bayar Üniversitesi, 1999. 10-17 s
- 28) Tiguert R, Lessard A, So A, et al. Prognostic markers in muscle invasive bladder cancer. *World J Urol* 2002; 20: 190-5
- 29) Hekimgil M. Tümör süpresör geni p53'ün moleküler, biyolojik ve klinikopatolojik özellikleri. *Spektrum Derlemeler'de*. (Editör: Emerk K). 1.baskı. İzmir, Açılım Yayıncılık, 1997; 63-75.
- 30) Levine A, Momend J, Finlay C. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-6.
- 31) Linzer I, Levine A. Characterization of a 54 K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*. 1979; 17: 43-52.
- 32) Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1979; 358: 15-16.
- 33) Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutation in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-78.
- 34) Bernardini S, Billerey C, Martin M, et al. The predictive value of muscularis mucosae invasion and p53 overexpression on progression of stage T1 bladder carcinoma. *The Journal of Urology* 2001; 165: 42-46
- 35) Esrig D, Elmajian D, Groshen S, et al. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med* 1994; 331(19): 1259-64
- 36) Arslan A, Büyükbayram H, Uzunlar K ve ark. The relationship between the expression of p53 and PCNA, and the tumour grade and stage in urinary bladder carcinoma. 16. Ulusal Patoloji Kongresi Özet Kitabı. Adana. 2001: 330.

- 37) Escalona-Lagos AE, Valero GFVG. Is p53 overexpression an independent marker in bladder urothelial carcinoma? *Histopathology* 2002; 41 (Supp 1): 64-206.
- 38) Rodriguez-Alonso A, Pita-Fernandez S, Gonzalez-Carrero J. P53 and Ki-67 expression as prognostic factors for cancer-related survival in stage T1 transitional cell bladder carcinoma. *European Urology* 2002; 41: 182-9.
- 39) Rodriguez-Alonso A, Pita-Fernandez S, Gonzalez-Carrero J. Multivariate analysis of survival, recurrence, progression and development of metastasis in T1 and T2a transitional cell bladder carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 1677-84.
- 40) Jahson S, Karlsson M. Tumor mapping of regional immunostaining for p21, p53, and mdm2 in locally advanced bladder carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 619-29.
- 41) Leissner J, Hohenfellner R, Thüroff JW, et al. Prognostic significance of histopathological grading and immunoreactivity for p53 and p21/WAF1 in grade 2 pTa transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur Urol* 2001; 39: 438-45.
- 42) Gerdes J, Lemke H, Baisch H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by monoclonal antibody Ki-67. *Immunol* 1984; 133: 1710-5.
- 43) Daniel M. Knowles. Immunophenotypic Markers Useful in the Diagnosis and Classification of Hematopoietic Neoplasms. In: Daniel M. Knowles , editor. *Neoplastic Hematopathology*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2001. p. 93-226
- 44) Wang W, Johansson H, Kvasnicka T, Farnebo LO, Grimelius L. Detection of apoptotic cells and expression of Ki-67 antigen, Bcl-2, p53 oncoproteins in human parathyroid adenoma. *APMIS* 1996; 104(11): 789-96
- 45) Bush C, Price P, Norton J, et al. Proliferation in human bladder carcinoma measured by Ki-67 antibody labelling: its potential clinical importance. *Br J Cancer* 1991; 64: 357-60.
- 46) Stavropoulos NE, Ioachim-Velogianni E, Hastazeris K, et al. Growth fractions in bladder cancer defined by Ki-67: Association with cancer grade, category and recurrence rate of superficial lesions. *British Journal of Urology* 1993; 72: 736-9.

- 47) Suwa Y, Takano Y, Iki M, et al. Prognostic significance of Ki-67 expression in transitional cell bladder carcinoma after radical cystectomy. *Pathol Res Pract* 1997; 193: 551-6.
- 48) Pfister C, Lacombe L, Vezina MC, et al. Prognostic value of the proliferative index determined by Ki-67 immunostaining in superficial bladder tumors. *Hum Pathol* 1999; 30: 1335-5.
- 49) Gontero P, Casetta G, Zitella A, et al. Evaluation of p53 overexpression, Ki-67 proliferative activity and mitotic index as markers of tumour recurrence in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 2000; 38: 287-96.
- 50) Korkolopoulou P, Konstantinidou AE, Christodoulou P, et al. Apoptosis in bladder carcinomas detected with monoclonal antibody to single-stranded DNA: Relation to cell cycle regulators and survival. *Urology* 2000; 56: 516-20.
- 51) Cleary ML, Sklar J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 7439-43.
- 52) Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992; 80: 879-86.
- 53) Hockenbery DM, Nunez G, Millman C. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348: 334-6.
- 54) Hockenbery DM. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; 75: 241-51.
- 55) Cleary ML, Smith SD, Sklar J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from t(14;18) translocation. *Cell* 1986; 47: 19-28.
- 56) Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6961-5.
- 57) LeBrun DP, Warnke RA, Cleary ML. Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. *Am J Pathol* 1993; 142: 743-53.
- 58) Lu QL, Paulson R, Wong L, Hanby AM. Bcl-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues. *J Pathol* 1993; 169: 431-7.
- 59) Cleary ML, Sklar J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint cluster region

near a transcriptionally active locus on chromosom 18. Proc Natl Acad Sci USA. 1985; 82: 7439-43.

- 60) Ong F, Moonen LMF, Gallee MPW, et al. Prognostic factors in transitional cell cancer of the bladder: an emerging role for bcl-2 and p53. Radiotherapy and Oncology 2001; 61: 169-75.
- 61) Wu TT, Chen JH, Lee YH, et al. The role of bcl-2, p53 and Ki-67 index in predicting tumor recurrence for low grade superficial transitional cell bladder carcinoma. The Journal of Urology 2000; 163: 758-60
- 62) Yan Y, Andriole GL, Humprey PA. Patterns of multiple recurrences of superficial (Ta/T1) transitional cell carcinoma of bladder and effects of clinicopathologic and biochemical factors. Cancer 2002; 95: 1239-46.
- 63) Kamai T, Takagi K, Asami H, et al. Decreasing of p27^{Kip1} and cyclin E protein levels is associated progression from superficial into invasive bladder cancer. British Journal of Cancer 2001; 84(9): 1242-51
- 64) Del Pizzo JJ, Borkowski A, Jacobs SC, et al. Loss of cell cycle regulators p27^{Kip1} and cyclin E in transitional cell carcinoma of the bladder correlates with tumor grade and patient survival. Am J Pathol 1999; 155: 1129-36.
- 65) Ravazolua P, Aletra C, Tsamandas A, et al. The role of cell cycle regulatory proteins, cyclin D1, cyclin E, p27 and p21 in bladder carcinogenesis. Histopathology 2002;41 (Suppl 1): 64-206.
- 66) Lee CCR, Ichihara T, Yamamoto S, et al. Reduced expression of the CDK inhibitor p27kip1 in rat two-stage bladder carcinogenesis and its association with expression profiles of p21waf1/cip1 and p53. Carcinogenesis 1999;20(9): 1697-1708.
- 67) Korkolopoulou P, Cristodoulou P, Konstantinidou AE, et al. Cell cycle regulators in bladder cancer: a multivariate survival study with emphasis on p27Kip1. Hum Pathol 2000; 31(6): 751-60.
- 68) Franke KH, Miklosi M, Goebell P, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{kip1} is expressed preferentially in early stages of urothelial carcinoma. Urology 2000; 56: 689-95.
- 69) Doğanay L, Altaner Ş, Bilgi S ve ark. Transizyonel hücreli mesane karsinomlarında p27^{Kip1} proteini ekspresyonunun prognostik değeri. 16. Ulusal Patoloji Kongresi Özet Kitabı. Adana. 2001: 330.

- 70) Steeg PS, Abrams JS. Cancer prognostics: past, present and p27. *Nat Med* 1997; 3: 152-4.
- 71) Marzo AM, Fedor HH, Gage WR, et al. Inadequate formalin fixation decreases reliability of p27^{Kip1} immunohistochemical staining: Probing optimal fixation time using high-density tissue microarrays. *Hum Pathol* 2002; 33(7): 756-60.
- 72) Collin LL, Bouchet AG, Escourrou G, et al. Expression p27^{Kip1} in bladder cancers: immunohistochemical study and prognostic value in a series of 95 cases. *Cancer Letters* 2002; 186: 115-20.
- 73) Primdahl H, Maase H, Sorensen FB, et al. Immunohistochemical study of the expression of cellcycle regulating proteins at different stages of bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128: 295-301
- 74) Sgambato A, Migaldi M, Faraglia B, et al. Cyclin D1 expression in papillary superficial bladder cancer: Its association with other cell cycle-associated proteins, cell proliferation and clinical outcome. *Int J Cancer* 2002; 97: 671-78.
- 75) Rabbani F, Charytonowicz, LU MN, et al. Prognostic significance of p27^{Kip1} expression in bladder cancer. *The Journal of Urology* 2002; 167(Suppl 4)119.
- 76) Kakizoe T, Tobisu K, Takai K. Relationship between papillary and nodular transitional cell carcinoma in the human urinary bladder. *Cancer Res* 1988; 48: 2293-303
- 77) Nakopoulou L, Vourlakou C, Zervas A, et al. The prevalence of bcl-2, p53 and Ki-67 immunoreactivity in transitional cell bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates. *Hum Pathol* 1998; 29: 146.
- 78) Kılıçarslan B, Köksal T, Özel E ve ark. Nüks mesane değişici epitel karsinomlarında p53 bcl-2 ve Ki-67 değerliklerinin önemi. 16. Ulusal Patoloji Kongresi Özet Kitabı. Adana. 2001: 334
- 79) Rödel C, Grabenbauer GG, Rödel F, et al. Apoptosis, p53, bcl-2, and Ki-67 in invasive bladder carcinoma: Possible predictors for response to radiochemotherapy and successful bladder preservation. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2000; 46(5): 1213-21.
- 80) Thomas GV, Szigeti K, Murphy M, et al. Down regulation of p27 is associated with development of colorectal adenocarcinoma metastases. *Am J Pathol* 1998; 153: 681-7.

- 81) Lessard A, Hovington H, Laure H, et al. Decreased p27 and cyclin E protein expression are factors of poor prognosis in patient treated by radical cystectomy for muscle invasive bladder cancer. *The Journal of Urology* 2002; 167(Suppl 4): 116.
- 82) Collin LL, Bouchet AG, Escourrou G, et al. Expression p27^{Kip1} in bladder cancers: immunohistochemical study and prognostic value in a series of 95 cases. *Cancer Letters* 2002; 186: 115-20.

