

T.C.

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

**MESANE TÜMÖRLÜ HASTALARDA KLİNİK PROGRESYONU
VE TEDAVİYE YANITI DEĞERLENDİRMEDE
PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTİGEN (PCNA)
Ki-67 ve NUCLEOLAR ORGANİZER REGION (AgNOR)'un
DEĞERİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. MURAT BOZLU

ANKARA, 1998

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ ve AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER..... 2

HASTALAR VE YÖNTEM..... 17

BULGULAR..... 22

TARTIŞMA..... 35

SONUÇLAR..... 44

ÖZET 46

KAYNAKLAR 45

I- GİRİŞ ve AMAÇ

Mesane tümörleri özellikle ülkemizde sık görülen tümörlerden biridir. İlk tanı konulduğunda çoğunlukla yüzeysel olan mesane tümörleri, multifokal olma ve sık nüks etme eğilimindedir.

Mesane tümörleri sık nüks eden tümörler olduğu için, tümörün nasıl davranacağını önceden belirlenmesi oldukça güçtür. Bu nedenle, tedavinin etkinliğinin önceden belirlenmesi de önemli bir sorundur.

Bu tez çalışmasında; mesane tümürlü hastalarda proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Ki-67 ve nucleolar organizer region (AgNOR) değerleri çalışılmış, elde edilen sonuçlar ile klinik progresyon arasındaki ilişki araştırılmıştır.

İkinci aşamada, PCNA, Ki-67 ve AgNOR değerleri incelenerek yüzeysel ve invaziv mesane tümürlü hastalarda, tedaviye olan yanıtı önceden belirleyebilecek prediktif bir sonuç elde edilmeye çalışılmıştır. Yüzeysel tümürlü hastalarda intravezikal BCG tedavisi, invaziv tümürlü hastalarda ise sistemik M-VEC kemoterapisi alanların PCNA, Ki-67 ve AgNOR değerleri incelenerek tedaviye olan yanıt ile ilişkileri araştırılmıştır.

II - GENEL BİLGİLER

Mesane kanserleri tüm tümörler içinde %2-3 oranında görülmekte olup, ürologlar tarafından en çok tedavi edilen hastalık grubunu oluşturmaktadır. Ürolojik kanserler içerisinde prostat kanserlerinden sonra ikinci sıklıkta görülmektedir. Üroepitelyal tümörlerin yaklaşık %90'ını oluşturmaktadırlar (1). Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan istatistiklere göre; erkek sekste %10 oranında görülüp prostat, akciğer ve kolorektal kanserlerden sonra en sık karşılaşılan 4. kanser tipidir (2, 3). Bu oran kadınlarda % 4 olup, kadın sekste görülen tümörler arasında 8. sırayı almaktadır. Erkeklerde kadınlardan 2-3 misli daha fazladır (2,3). En sık 65 yaş ve civarında görülür. Etyolojide sigara içme, beta naftilamin ve benzidin gibi aromatik aminler ve şistozomiazis gibi kesin etkili olduğu bilinen risk faktörleri yanında fenasetin, kahve, alkol gibi daha zayıf etkili faktörler de suçlanmaktadır (4,5).

Mesane kanserlerinin %98'i epitelyal orijinli olup, bunların %92'si transizyonel hücreli, %7'si skuamöz, %1-2'si adenokanser yapısındadır (5).

Mesane kanserlerinin, tanı anında %75-85'i yüzeysel tümörlerdir (4). Mesane tümörlerinin evrelendirilmesinde T_{is} , T_a , T_1 yüzeysel tümörler, T_2 , T_{3a} , T_{3b} , T_{4a} , T_{4b} invaziv tümörler olarak sınıflandırılmıştır (6). Yüzeysel tümörlerin çoğu papiller tümörler olup, papiller tümörlerin çoğu da T_a tümörlerdir. T_a tümörlerin %90-95'i iyi diferansiye ve düşük gradeli, T_1 tümörlerin %60'ı grade II ve %25-35'i grade III tümörlerdir (1,4,5). Yüzeysel tümörlerin %50-60'ı sık rekürrens gösterir ve %10-20 kasa invaziv ya da metastatik tümörler halini alırlar (7).

İnvaziv mesane kanseri olan hastaların %50 kadarının tanı anında okült uzak metastazları mevcuttur ve bu grupta bir yıl içinde aşikar klinik metastazlar görülür. Metastatik hastalığı olanların ise tüme yakını yaklaşık iki yıl içerisinde ölür (8, 9, 10, 11). İnvaziv kanseri olan hastaların %5'ten az bir kısmı iyi klinik seyir gösterir ve beş yıldan fazla yaşayabilir (12).

Mesane tümörlerinde tanıda anamnez, fizik muayene, rutin laboratuvar tetkiklerinden sonra DÜSG, İVP, sistografi, ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi, MRI gibi görüntüleme yöntemlerinin yeri vardır. Ancak en değerli yöntem sistoskopi ve beraberinde alınan biyopsi veya sitolojinin histopatolojik değerlendirilmesidir. Bu şekilde hem tanı ve hem de evrelendirme yapılmakta ve uygulanacak tedaviye karar verilmektedir.

Mesane tümörlerinde belli başlı tedavi yöntemleri TUR, TUL, açık rezeksiyonlar, sistektomi (parsiyel, basit, total, radikal), kemoterapi (sistemik, lokal) immünoterapi (sistemik, lokal) şeklindedir. Bu tedavi şekilleri tek tek veya yerine göre kombine olarak uygulanabilmektedir (13).

Mesane kanserleri, yapılan evrelendirmeye uygun portokoldeki tedaviye rağmen yüksek oranda nüks ve progresyon göstermektedir. Bu nedenle klinik seyri önceden belirlemek ve uygun tedavi programları uygulayabilmek için pek çok çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda bir çok prognostik parametreler ortaya konmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. Mesane tümörlerinde prognoz ve proliferasyonun değerlendirilmesinde kullanılan kriterler:

I. Klinik	II. Endoskopik ve radyolojik	III. Histopatolojik	IV. Laboratuvar
1) Semptomların süresi	1) Tümör sayısı	1) Tümör grade'i	1) Kan grup antijenlerinin baskılanması
2) Hastanın yaşı	2) Tümör büyüklüğü	2) İnvazyon derinliği	2) Onkofetal proteinler
3) Tümör nüksünün sıklığı	3) Papiller veya solid	3) Lenfatik veya vasküler invazyon varlığı	3) Epidermal growth faktör reseptörleri
4) Hastanın genel durumu	3) Papiller veya solid konfigürasyon	4) Mukozal anormallikler, epitelyal atipi ve displazi	4) Lektin bağlayan karbonhidrat yapılar
			5) p105, PCNA, Ki-67 gibi proliferatif antijenler
			6) Onkogenler (C-erb B-2, H-ras, c-myc gibi)
			7) Tümör baskılayıcı genler (p53, NM-23, retinoblastoma geni gibi)
			8) DNA flowsitometri
			9) Kromozom anomalileri (9.kromozom uzun kolunda kayıp, izokromozom 5p, 17p delesyonu, trizomi 15)
			10) Tümör asosiye antijenleri (M344, 19 A211, T43. T138)
			11) Periferik kan lenfosit alt gruplarının flowsitometrik analizi

Tümör evresi; önemli bir prognostik parametredir. Evre yükseldikçe nüks ve progresyon görülme sıklığı artmaktadır. Tedavi planlanırken göz önünde tutulması gereken bir kriter olarak karşımıza çıkar (14).

Tümör grade'i; tümör evresi kadar önemli bir parametre olup, genellikle evre ile paralel seyreder. Tümör evresinde olduğu gibi grade yükseldikçe progresyon ve nüks oranları artar (15). Tedavi seçiminde önemli bir kriterdir.

Tümörün papiller veya solid konfigürasyonda olması; diğer önemli parametredir. Papiller tümörler, solid olanlara nazaran daha iyi prognoz gösterirler (16).

Tümör sayısı ve boyutu arttıkça; nüks ve progresyon oranları artmaktadır (17).

Diffüz insitu karsinoma bulunan vakalarda nüks ve progresyon oranı yüksektir (18).

Vasküler invazyon varlığı rekürrens ve progresyon ihtimalini arttırmaktadır (19).

Çevresinde lenfoid reaksiyon gösteren tümörlerin daha iyi prognoz gösterdiği bildirilmiştir (20).

Kan grup antijenleri saptanamayan vakalarda tümör daha agresif seyretmektedir (21).

p53 ekspresyonunun artmasıyla beraber tümör grade, evre ve progresyonunun arttığı bildirilmiştir (22).

DNA içerik analizi yapıldığında; nondiploid dağılım gösteren tümörler diploid yapı gösterenlerden daha agresif seyretmektedir (23).

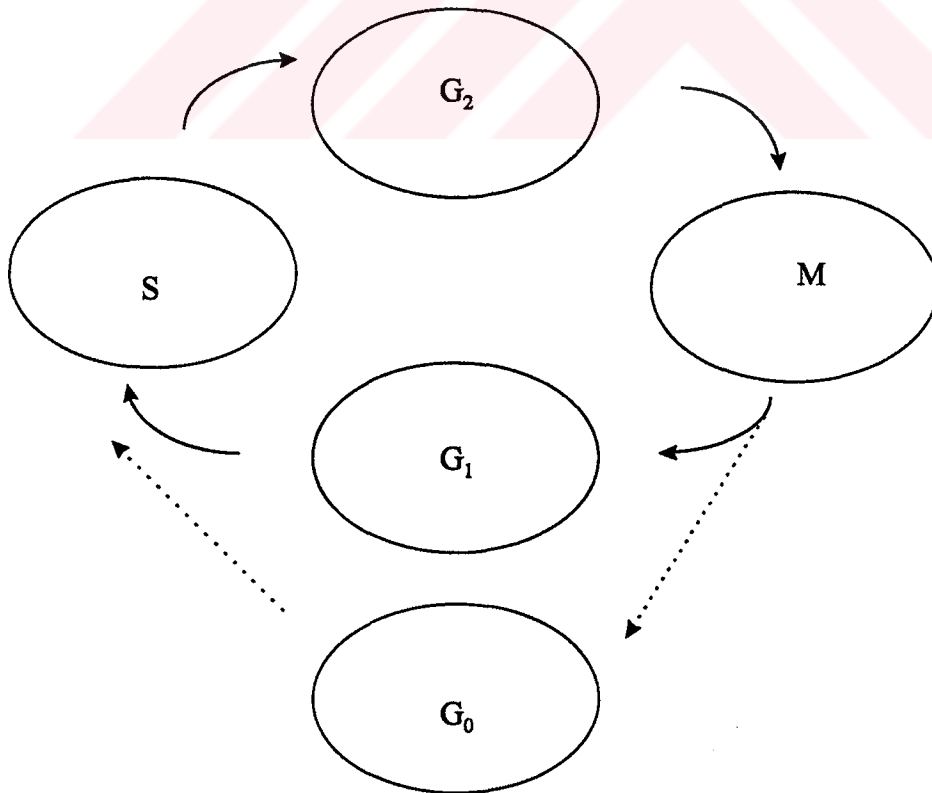
Mesane tümörlü bazı vakalarda tümörün biyolojik davranışı, tümör grade'i, evresi, tümör tipi gibi prognostik kriterler ile tam olarak belirlenememektedir. Son yıllarda bu kriterlere ek olarak, kantitatif olması nedeniyle daha objektif olan ve grade'leme hakkında daha çok bilgi vereceğine

inanılan yöntemler üzerinde çalışılmaktadır. Bu yöntemlerden biri de proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Ki-67 ve Nucleolar Organizer Region (AgNOR) değerlerinin hesaplanarak proliferasyon indeksinin belirlenmesidir. Proliferasyon indeksinin incelenmesi, diğer prognostik kriterlerle beraber değerlendirilip, uygulanacak tedavinin yeniden gözden geçirilmesini ve tedavi sonrası sıkı takibi olanaklı kılacaktır (24, 25, 26, 27).

Proliferasyon indeksini daha iyi anlayabilmek için hücre siklusunu bilmek gerekmektedir.

Hücre Siklusu ve Proliferasyon Marker'ları:

Çok hücreli organizmalarda, nekroz, apoptozis ve diğer nedenlerle olan hücre kayıplarının yerinin doldurulması için, hücrelerin çoğalması yani bölünmesi gerekmektedir. Hücre siklusu hücre tiplerine göre değişkenlik gösterir. Hücre siklusu çeşitli fazlar halinde incelenmektedir (Şekil 1) (28).



Şekil 1. Hücre siklusu.

Bunlar içinde en dikkat çekici olan mitozdur (M fazı). Bu fazda nükleer bölünme gerçekleşir. Siklusta çok kısa bir süre tutar. Nükleer kılıf ortadan kalkar, nükleus içeriği kromozomlar halinde yoğunlaşır. Hücredeki mikrotübüllerin de yardımıyla bu kromozomlarla mitotik spindl oluşur. Mitoz ilerlerken metafaz aşamasında kısa bir duraklama olur. Çift hale gelmiş kromozomlar ayrılmaya başlar. Bu çift kromozomların ayrılması ile anafaz başlar. Anafazda kromozomlar ayrılarak spindllerin iki ucuna doğru çekilirler. Burada tekrar yoğunlaşarak tam bir nükleus oluştururlar. Bundan sonra hücrenin tamamen ikiye bölündüğü "sitokinesis" fazı gerçekleşir (29).

Siklusta M fazının dışındaki süre genel olarak "interfaz" şeklinde tanımlanmaktadır. Bu süre sırasında hücreler oldukça aktiftir. Belirli bir düzen ve sıra içinde siklus için gerekli hazırlıklar yapılır. Ayrıca interfaz sırasında kısmen DNA replikasyonu olur. Bu nükleer DNA replikasyonu interfazın sadece küçük bir kısmını oluşturur. Bu döneme S(sentez) fazı ismi verilir. Mitoz bitimi ile S fazı arasındaki süreye G_1 (birinci gap) ismi verilmektedir. S fazı sonu ile M fazı arası ise G_2 (ikinci gap) fazını oluşturmaktadır. G_1 ve G_2 fazları, hücreye mitoz öncesi yeterli miktarda büyüebilmesi için süre kazandırmaktadır. G_2 fazı hücre için güvenlik süresidir, DNA hasarının tamiri gerçekleşir. Mitoza girmeden önce DNA replikasyonunun tamamlanmış olması sağlanır.

Memelilerde hücre siklusu en az 12 saat veya daha uzun sürer. En fazla değişkenlik G_1 süresinde izlenmektedir. G_1 'deki hücreler DNA replikasyonu yapmayıp dinlenme fazı olan G_0 'a geçerek siklustan çıkabilirler. G_0 'da proliferasyon olmadan günler, haftalar veya yıllarca kalabilir (29).

Kanserlerin çoğunda prognoz ile proliferasyon arasında korelasyon bulunduğu bildirildiği için, tümörlerin proliferasyon hızlarının ölçümü ve buna dayanılarak, biyolojik davranışların belirlenilmeye çalışılması, son yıllarda gittikçe önem kazanan bir konu haline gelmiştir (30). Tümör hücrelerinin proliferasyonu ve hücreler arasındaki denge, tümörün büyüme hızını belirlemektedir. Hücre siklus zamanı ve proliferatif hücrelerin oranı tümörün proliferasyon durumunu belirler.

Mitoz sayısı, proliferasyon durumunu ölçmede kullanılan en eski yöntemdir. Mitoz sayısı, tümoral hücre popülasyonunda sadece M fazındaki hücrelerin oranı hakkında bilgi verir. Ancak daha önce de belirtildiği gibi M fazı siklusun çok küçük bir kısmını oluşturmaktadır. Bu yöntemle diğer fazlarda bulunan proliferatif hücrelerin saptanması mümkün değildir (31, 32).

1960'ların başında, DNA sentezinde kullanılan bir madde olan timidin ile S fazındaki hücreler saptanmaya başlanmıştır. Bu madde tritiated timidin formunda radyoaktif olarak işaretlenebilmektedir. Diğer bir yöntem ise timidinin suni bir analogu olan Bromodeoksi Uridin' in (BrdU) kullanılmasıdır. Anti-BrdU antikorlar ile S fazında olup BrdU kullanan hücreler immünohistokimyasal (İHK) olarak saptanabilmektedir. Her iki yöntemde de sadece S fazındaki hücreler saptanabilmekte ve bu maddelerin önceden hücrelere uygulanması gibi pahalı ve zaman alıcı hazırlık işlemleri gerekmektedir. Tritiated timidin ise radyoaktif ve solid dokulara penetrasyonu zor olduğu için pek tercih edilmemektedir.

1970'lerin başında flow sitometri kullanım alanına girmiştir. Hücre siklusu hakkında hızlı ve objektif bilgi verebilmektedir. S, G2, M fazındaki hücreleri saptar. Ancak fazla miktarda tümör dokusu gerektirmekte, küçük biyopsilerde

kullanışlı olmamaktadır. Ayrıca G1 fazındaki hücreler saptanamamaktadır. Bir dezavantajı da morfoloji imkanı olmaması ve arada tümör dışı hücrelerin de değerlendirilmesidir (35).

İmmünohistokimyasal yöntemlerin kullanılmasının artmasıyla, özellikle hücre siklusuna eşlik eden antijenlerin immünohistokimyasal olarak saptanması, hücre kinetiği ile ilgili çalışmalarda daha fazla tercih edilir olmuştur. Bunlardan en fazla çalışılan DNA polimeraz alfa'dır. Bu antijen tüm proliferatif ökaryotik hücrelerde DNA replikasyonunda anahtar enzim rolündedir. Bu enzim İHK'sal olarak çoğu insan tümöründe çalışılmıştır. Diğer proliferasyon marker'ları ile paralel sonuçlar verdiği ve tümörlerin proliferatif aktivasyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmektedir. Ancak frozen materyal gerektirmekte ve değerlendirmeler arasında çok fazla farklılıklar göstermektedir (36).

Aktif olarak bölünen ve proliferatif olan hücrelerde bulunan diğer nükleer antijenlerden Ki-67 ve PCNA en önemlileri arasında sayılabilir. Bu antigenlere karşı geliştirilen antikorlar proliferasyon marker'i olarak kullanılmaktadır (24, 25).

Ki-67:

Ki-67 antijeni non-histon nükleer bir proteindir. 345-395 KD ağırlığında iki polipeptid zincirden meydana gelir. Molekül ağırlığı yüksek ve proteazlara çok hassas bir gen ürünüdür. Ki-67 geni 10q25'te lokalizedir. Ki 67 nükleusta, kromatin ve mitoz sırasında da kromatidlerle sıkı ilişki halindedir. İleri derecede bazik bir proteindir. DNA'yı bağlama özelliği bulunan yapısal bir protein olduğu ileri sürülmektedir. Fonksiyonu kesin olarak bilinmemektedir. Ancak 3' ve 5' domainlerin düzenleyici fonksiyonlarının bulunabileceği veya diğer non-DNA

yapılarla ilişkileri kontrol ediyor olabileceği düşünülmektedir. Prolifere olan bütün canlı hücrelerinde bulunmaktadır (37).

Ki-67 antikorı ilk defa 1983 yılında Gerdes ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (38). Özellikle 1985'den sonra Ki-67 antikorları ile yapılan çalışmalar hızla artmıştır. Monoklinal Ki-67. antikorunu elde etmek için antijen olarak Hodgkin hastalarından köken alan L428 hücrelerinin nükleer parçaları kullanılmıştır. Kiel'de üretildiği ve antikor üreten klon 67. kültür plağında olduğu için Ki-67 olarak adlandırılmıştır, Ki-67 antigenini tanımaktadır. Ki-67 antijeni, G₀ ve erken G₁ fazı dışında siklusta bütün fazlarda eksprese edilmektedir. Antijenin % 90'ı nükleolde, % 5 -10'u ise nükleoplazmada bulunmakta, metafazda kromozomların yüzeyinde izlenmektedir (39).

Nükleustaki Ki-67 antijen miktar ve dağılımı siklus fazına göre değişiklik göstermektedir. Siklus ilerledikçe antijenik ekspresyon artar. Bu artış S fazının ikinci yarısında başlar, hücre G₂ ve M fazlarında iken Ki-67 antijen ekspresyonu en yüksek seviyelere çıkar. Bu artış hem normal, hem de neoplastik hücrelerde izlenir. Geç G₁ fazında Ki-67 antijeni perinükleoler yerleşimlidir. S fazında nükleoplazmada homojen olarak dağılır. G₂ fazında ince granüler, dağınık bir patern ile perinükleoler bir boyamanın karışımı izlenir. Mitoz sırasında profaz ve metafazda perikromozomal boyanma bulunurken, profazda buna nükleoplazmik, metafazda ise sitoplazmik boyanma da eşlik eder. Anafaz ve telofaz sırasında boyanma yoğunluğu hızla azalır (25, 40).

Ki-67 ekspresyonu hücrenin beslenme durumundan çok fazla etkilenmektedir. Nutrisyonel olarak baskılanmış hücreler daha yavaş büyümekte, hücre siklusu uzamakta ve daha uzun süre Ki-67 ekspresyonu

görülmektedir. Ayrıca iyi beslenemeyen tümör hücreleri hücre siklusunun çeşitli fazlarında duraklayabilmektedir (41).

Ki-67 antijeninin siklustaki gerçek fonksiyonu bilinmemektedir. Ancak bir ayarlayıcı molekül olduğu düşünülmektedir. İnsan da dahil çoğu canlı türünde, normal ve neoplastik hücrelerde saptanmıştır. Bu geniş evrimsel yaygınlık nedeniyle hücre proliferasyonunun regülasyonunda çok önemli rolü olduğu düşünülmektedir (25).

Ki-67 proteini çok sayıda prolin, glutamik asit, serin, trionin motifi içermektedir. Bu nedenle çok hızlı katabolize olmaktadır. Yarı ömrü çok kısa olup, bu süre yaklaşık 1 saattir. Bu nedenle ve G_0 dışında siklusun bütün fazlarında eksprese edildiğinden, siklustaki hücrelerin saptanması açısından çok yararlı bir belirleyici (marker) olabileceği düşünülmektedir (42).

Ki-67 antikor, Ki-67 antijeninin labil bir epitopunu tanımaktadır. Bu epitop sadece frozen kesitlerde saptanabilmektedir. Ki-67 antikorunun kullanımı sınırlayan bu özelliği nedeni ile, murine monoklonal antikorlar olan ve parafine gömülmüş formalin tespitli dokularda da çalışabilen MIB-1 ve MIB-3 antikorları üretilmiştir. Ki-67 antijeninin, rekombinant parçalarına karşı immünize edilmiş farelerden elde edilen bir antikordur. MIB-1'in, Ki-67 antikoruna eşdeğer ve daha avantajlı olduğu ispatlanmıştır. MIB-1 optimal morfoloji korunumuna eşlik eden kuvvetli bir immünreaksiyon göstermektedir. Pozitif ve negatif hücreler arasında çok net bir ayırma imkan vermektedir (43).

Yapılan invitro çalışmalarda, MIB-1 boyanması ile hücre siklusu arasında sıkı bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Gerek frozen kesitlerde çalışan Ki-67 antikor, gerekse MIB-1 ile yapılan çok sayıdaki çalışmalarda bu proliferasyon

marker'ının tümörlerde proliferatif aktiviteyi oldukça iyi yansıtabileceği bildirilmektedir (44, 45).

Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA):

İmmünohistokimyasal olarak çalışılan diğer bir proliferasyon marker'ı ise "Proliferating Cell Nuclear Antigen" dir. PCNA 36 KD ağırlığında non-histon, asidik bir nükleer proteindir. 262 aminoasit sekanslı bir yapısı vardır ve DNA polimeraz deltanın kofaktörüdür. İlk defa 1978'de SLE'li hastaların nükleer antigenlerine karşı reaktif serumlarında saptanmıştır (46). DNA polimeraz delta, S fazında, DNA'nın replikasyonu sırasında rol alır. DNA polimeraz deltanın, DNA replikasyonunda rolü bulunduğu ve hücre siklusunda düzenleyici bir protein olduğu kabul edilmektedir. Temel olarak S fazında eksprese edilmekle birlikte geç G₁ ve G₂-M interfazlarında da daha az oranlarda saptanabilmektedir. PCNA'nın DNA sentezi ve hücre proliferasyonunun başlatılmasında önemli role sahip olduğu düşünülmektedir (47).

PCNA hücrede iki çeşit boyanma paterni gösterebilir. Granüler boyanma muhtemelen replizoma bağlı PCNA kaynaklıdır. Sitoplazmik boyanma paterni ise mitotik hücrelerde saptanmaktadır. S fazında granüler paterndeki PCNA boyanması subfazlara göre farklılıklar göstermektedir. Erken S fazında nükleusta, dağılımı homojen olmayan küçük noktacıklar şeklinde izlenir. Bu noktalar nükleus periferinde ve perinükleoler kısımda bulunmazlar. Muhtemelen çok sayıda replizom demetleri bulunduran, replikom domainlerine bağlıdır. S fazı ilerledikçe noktacıklarda sayıca belirgin artış vardır. Daha sonra nükleus periferinde ve perinükleoler alanda da noktacıklar izlenir. S fazının sonlarına doğru noktacıkların sayısında ve boyutlarında artış olmaktadır. Bunun nedeni

geç replike olan heterokromatin yakınlaşmasıdır. S fazının sonunda ise DNA replikasyonu olmaktadır ve noktacıklarda artış sınırlı sayıdadır. Çoğu çift şeklinde dağılım göstermektedir (48).

Non S fazındaki PCNA boyamasının ise fiksasyon ve antikör tipine bağlı olduğu ve deterjanlarla azaltılabileceği bildirilmektedir. Parafin kesitlerde S fazı spesifik PCNA boyaması ile non S faz boyanması güvenli bir şekilde ayıramamaktadır (49).

PC10, PCNA'ya karşı geliştirilmiş, Wassem ve Lane tarafından karakterize edilmiş, formalin tesbitli, parafine gömülmüş dokularda da başarılı sonuçlar veren monoklonal bir antikördür. Ancak tespit süresinden etkilenmektedir. 24 saatten daha uzun tespitlerde immünreaksiyon azalmakta, 72 saatten daha uzun süre formalinde kalmış materyallerde ise boyanma olmamaktadır (50).

PCNA'nın proliferasyon marker'ı olarak kullanılmasında bazı sakıncalar vardır. Bunun nedenlerinden birisi yarı ömrünün uzun olmasıdır. Yaklaşık olarak 20 satten daha uzun olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle siklustan çıkmış olan hücrelerde de PCNA saptanabilmektedir. Diğer bir istenmeyen özelliği de PCNA'nın sitokinler ve growth faktörlerden etkileniyor olmasıdır. İnflamatuvar hücreler veya ortamda bulunan tümoral hücrelerden salınan growth faktörler muhtemelen mRNA stabilitesini arttırmakta ve siklusta bulunmayan hücrelerde bile PCNA ekspresyonunununa neden olmaktadır. Yapılan son çalışmalar PCNA'nın nükleotid eksizyon tamir olayında da rol aldığını göstermektedir. Bu özellikleri nedeni ile siklusta olmayan, DNA'sı hasarlanmış hücrelerde de PCNA ekspresyonu saptanabilmektedir (51).

PCNA'nın immünhistokimyasal olarak saptanması hem aktif DNA replikasyonunu, hem de karsinogenez ile sonuçlanan DNA hasarını göstermektedir. Bunun ekspresyonu, düzensiz hücre proliferasyonunun göstergesi olarak kullanılabilir. Ancak diğer proliferasyon marker'ları ile kar ıla tırıldı ında, özellikleri nedeniyle genellikle daha yüksek sonuçlar vermektedir (52).

AgNOR:

Hücre kinetiği ile ilgili araştırmalarda kullanılan bir yöntemdir. G m   nitrat solüsyonları içeren bazı boyama yöntemleri 1800'l  yıllardan sonra, nöral dokuların incelenmesi amacıyla kullanılmaya ba lanmıştı. 1937'de Page ve arkadaşları tümör hücresi n kleollerinde normal hücre n kleollerinden daha fazla gümüş boyanan cisimcik bulunduğunu ve bu yapılar ile tümör malignitesi arasında bir ilişki olabileceğini ileri sürmüştür. Howell ve arkadaşları ile Goodpasture ve arkadaşları 1975'te, insanda D ve G grubu 13, 14, 15 ve 21, 22 no'lu akrosentrik kromozomların kısa kollarının, g m  leme yöntemi ile boyanabilece ini ve gümüş boyasından sorumlu olan maddenin kromozomlardaki nükleik asitle birlikte bulunan bir takım asidik proteinler olduğunu bildirmiştir. Insitu hibridizasyon yöntemleri ile boyanan bu bölgelerin rRNA segmentleri içerdiği saptanmış ve bu segmentlere "Nucleolar Organizer Regions: NORs" AgNOR'lar adı verilmiştir (53, 54).

Bugünkü AgNOR tekniğinin temeli sayılan bu yöntemler uzun yıllar genetik bilimi dışında kullanım alanı bulamamıştır. Yöntem 1980'li yıllarda Howell ve ark. ile Ploton ve ark. tarafından teknik açıdan geliştirilerek parafin blok kesitlerde de uygulanır hale getirilmiştir. Benign ve malign lezyonlar

arasında AgNOR sayı ve dağılımı yönünden belirgin bir farklılık vardır. Daha sonra bu basit yöntem Crocker ve ark.'ın başlattığı çalışmalar ile patoloji alanına girmiştir. Son yıllar içinde, yöntemin tanısal ve prognostik olarak tümör patolojisinde, hücre proliferasyon marker'ı olarak değerini ele alan çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bunların çoğunda, hücre proliferasyon kapasitesinin belirlenmesinde, AgNOR yönteminin değeri vurgulanmaktadır. Son yapılan çalışmalarda AgNOR değerinin, hücrenin ploidisini yansıttığı ve dolaylı olarak proliferatif aktiviteyi gösterdiği ileri sürülmektedir (55).

AgNOR yönteminde gümüş ile boyamayı sağlayan ve rRNA ile birlikte bulunan proteinler "nucleolar organizer region associated proteins" kısaca "NORAPs" veya "AgNOR proteinleri" olarak adlandırılmaktadır. AgNOR proteinlerinin tümünün ayrıntılı yapısı tam olarak belirlenememiştir. Ancak bugün AgNOR proteinlerinin genel olarak non-histon yapısında asidik fosfoproteinler olduğu bilinmektedir (56). Başlıca AgNOR proteinleri; RNA polimeraz 1, nükleolin (C 23), B23, 100 KD, 80 KD, 135 KD, 105 ve 116 KD'luk nükleoler fosfoproteinler.

Yapılan çalışmalara göre AgNOR proteinleri, rRNA gen bölgesinin veya daha geniş anlamıyla NOR'ların yapısal elemanlarındadır ve onlarla morfolojik bütünlük içindedir. Bu proteinlerin rRNA ve NOR'larla ne gibi bir fonksiyonel bütünlük içinde olduğu araştırılmaktadır. AgNOR proteinlerinden RNA polimeraz 1'in, rRNA genlerinin transkripsiyonunu sağlayan enzim olduğu bilinmektedir. Diğer nükleoler proteinlerin, RNA polimeraz 1 ve rRNA'nın transkripsiyon kompleksinin davranışlarını düzenlediği düşünülmektedir (57).

AgNOR değeriendirilirken amaç nükleus başına düşen ortalama NOR sayısının saptanmasıdır. Teknik olarak boya s resinin uzaması AgNOR'ların büyüyerek birleşmesine ve gerçekte olduğundan daha fazla düşük sayıda AgNOR değeriinin elde edilmesine neden olabilmektedir. İki ayrı sayım tekniği bulunmaktadır. Crocker sisteminde, nükleusta nükleol içinde ve dışındaki benek ikler tek tek sayılmaktadır. Howel ve ark.'larının geliştirdiği sayım tekniğinde ise optimum boya s resinin uygulanamadığı durumlarda kullanılır. Bu teknikte nükleol içinde ve perinükleoler cisimcikler halinde ayrı ayrı değil ana gruplar halinde sayılmaktadır (58).



III- HASTALAR VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Ocak 1995 - Aralık 1997 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi İbn-i Sina Hastanesi Üroloji Anabilim Dalı'na başvuran 77 mesane tümörlü hasta ve kontrol grubu olarak herhangi bir malignitesi olmayan 13 hasta dahil edilmiştir. Vakaların 78'i erkek, 12'si kadın idi. Hastaların yaş dağılımı 26-80 yıl arasında olup ortalama yaş 58.5 ± 10.5 yıl idi. Takip süreleri 3-36 ay arasında değişmekte olup ortalama takip süresi 20.7 ± 4.8 ay idi.

Çalışmayı dahil edilen tüm vakaların detaylı anamnezleri alındı ve fizik muayeneleri yapıldı. Rutin olarak kan biyokimyası, idrar ve tam kan analizleri yapıldıktan sonra p.a. akciğer grafisi, direkt üriner sistem grafisi, intravenöz pyelografi, sistografi, üriner ultrasonografi ve bilgisayarlı tomografi, uygun vakalarda magnetik rezonans görüntüleme (MRG) tetkikleri yapıldı. Daha sonra hastalar, sistoskopi ve biyopsi ile klinik ve histopatolojik tanı konularak evrelendirildi. Preparatlar, transüretral rezeksiyon, transvezikal rezeksiyon, parsiyel veya total sistektomi materyallerinden hazırlanmıştır. Çalışma prospektif olarak yapılmış ve her hasta için üç ayda bir, takip eden yıllar için altı ayda bir olacak şekilde kontroller yapılmıştır. Hastaların hepsinin tanısı, ilk kez kliniğimizde konulmuştur. Proliferasyon indeksleri (PCNA, Ki-67 ve AgNOR) için alınan örnekler; hastalara kemoterapi, immünoterapi veya radyoterapi uygulanmadan önce alınmıştır. Kontrol grubunun mesane örnekleri, transvezikal sistolitotomi veya transvezikal prostatektomi yapılan hastalardan elde edilmiştir.

Histopatolojik İnceleme:

Histopatolojik incelemede tümör vakalarına ait hematoksilen eozin boyalı preparatlar ışık mikroskopik olarak tekrar değerlendirilerek dörtlü grade'leme sistemine göre değerlendirilmiştir (59).

İmmünhistokimya:

Her vaka için vakayı temsil eden bir adet parafin blok seçilmiş ve 5 mikron kalınlığında kesitler poly-L-lysin (sigma) ile kaplı lamlara alınmıştır. Bu kesitlere streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile (Zymed histostain kit) PCNA (PC10/Zymed) ve Ki-67 (MIB-1/Zymed) antijenlerine karşı geliştirilen monoklonal antikolar kullanılarak immünhistokimyasal boyama yapılmıştır. Hazırlanan kesitlere immünhistokimyasal boyama için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır:

1. Deparafinizasyon
2. "Antigen retrival solution" içinde mikrodalga fırında bekletme (4x5 dakika)
3. Oda sıcaklığında soğuma (20 dakika)
4. PBS ile yıkama (5 dakika)
5. % 3'lük hidrojen peroksit ile endojen peroksidaz aktivitesinin ortadan kaldırılması (5 dakika)
6. PBS ile yıkama (5 dakika)
7. "Protein blocking solution" ile inkübasyon (15 dakika)
8. Kesit üzerindeki solüsyonun fazlasının silkelenip primer antikor tatbiki (PCNA: 1/50 dilüsyon, Ki-67: 1/50 dilüsyon) (2 saat)
9. PBS ile yıkama (5 dakika)

10. Biotin Konjuge sekonder antikor ile inkübasyon (15 dakika)
11. PBS ile yıkama (5 dakika)
12. Streptavidin - peroksidaz kompleksi ile inkübasyon (15 dakika)
13. PBS ile yıkama (5 dakika)
14. Amino-Etil-Carbazol (AEC) kromojen uygulanması (5 dakika)
15. PBS ile yıkama (5 dakika)
16. Counterstaining (zemin boyaması için) Mayer's hematoksilin uygulanması (2 dakika)
17. Musluk suyu ile yıkama (5 dakika)
18. "Aqueous mounting medium" ile kapama

Her iki antikor için pozitif kontrol olarak normal tonsil dokusuna ait parafin kesitler kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak primer antikor yerine PBS kullanılarak diğer basamaklar aynen uygulanmıştır.

Değerlendirme sırasında nükleuslardaki kahverengi-kırmızı boyanma pozitif olarak kabul edilmiştir. PCNA ve Ki-67 antikorları için her kesitte ışık mikroskobu ile x400 büyütmede 1000 tümör hücresi sayılarak pozitif hücrelerin yüzdesi bulunmuştur, bulunan bu rakamlar PCNA ve Ki-67 indeksi olarak ifade edilmiştir.

AgNOR Boyaması:

1. Deparafinizasyon
2. Distile suda bekletme (5 dakika)
3. Kesitlerin oda sıcaklığında karanlık ortamda 45 dakika AgNOR çözeltisi içinde bekletilmesi (AgNOR çözeltisi % 1'lik formik asit içinde % 2'lik

jelatin çözdürölüp bu solüsyondan 1 ölçü alınarak 2 ölçü % 50'lik sıvı gümüş nitrat ile karıştırılarak elde edilmiştir).

4. Distile su ile yıkama (5 dakika)

5. Alkolde bekletme (4 dakika)

6. Ksilende bekletme (2x3 dakika)

7. Mountain medium ile kaplama

Değerlendirme için immersion objektifi ile x1000 büyütmede 100 hücrede NOR'lar sayılmış ve hücre başına düşen ortalama NOR sayısı AgNOR değeri olarak saptanmıştır. AgNOR sayım için Crocker sistemi kullanılmıştır (58).

İstatistiksel Analizler:

Kontrol grubu ve mesane tümörlü hastaların PCNA, Ki-67 ve AgNOR değerleri hesaplanarak ortalama $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir.

Hastaların grade, evre, PCNA, Ki-67 ve AgNOR değerlerinin birbirleriyle ilişkisini belirlemek amacıyla Kruskal-Wallis varyans analizi yapılmış, herbiri için korelasyon katsayıları Pearson'un korelasyon katsayısı şeklinde ifade edilmiştir (r). Kontrol ve hasta grubunun PCNA, Ki-67 ve AgNOR değerleri karşılaştırılırken Mann-Whitney U testi kullanılmış ve $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. Yüzeyel ve invaziv tümörlerin PCNA, Ki-67 ve AgNOR değerleri karşılaştırılırken student's t testi kullanılmıştır. Tedaviye göre remisyon ve progresyon gösteren hastaların PCNA, Ki-67 ve AgNOR değerlerinin tedaviye yanıt ile ilişkisini analiz etmek için Mann-Whitney U ve Wilcoxon testleri kullanılmıştır. Analizlerde $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Tüm parametreler için logistik regresyon testi yapılarak hangilerinin bağımsız prognostik değere sahip olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca tedaviye yanıt veren veya progresyon gösteren gruplarda PCNA, Ki-67 ve AgNOR için eşik değerler hesaplanmış; sürekli dağılım gösteren değişkenlerde çeşitli kesim noktaları kullanılarak spesifite, sensitivite, pozitif tahmini değer (ppv) ve negatif tahmini değer (npv) hesaplanmıştır.



IV- BULGULAR

Mesane tümörü tanısı konulan 77 hastanın tümör materyalleri ve kontrol grubu olarak alınan 13 vakanın materyalleri PCNA, Ki-67 ve AgNOR boyaları ile boyanarak proliferasyon indeksleri hesaplandı. Ayrıca tümörlü hastaların hepsinin evresi, grade'i tümör boyutu, tümör sayısı uygulanan tedaviye tümörün yanıtı ve rekürrens olup olmadığı hazırlanan takip protokollerine kaydedilerek analiz edildi.

Vakaların 12'si kadın, 78'i erkek olup yaş dağılımı 26-80 yıl arasında ve ortalama yaş 58.5 ± 10.5 yıl olarak bulunmuştur. Hastaların takip süreleri 3-36 ay arasında olup ortalama takip süresi 20.7 ± 4.8 ay idi (Tablo 2).

Tablo 2. Hastaların cinsiyet, yaş ve takip süreleri

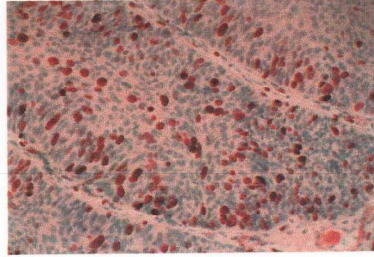
- Kadın / Erkek oranı	:	12 / 78
- Yaş Dağılımı	:	26-80 yıl (ort. yaş 58.5 ± 10.5 yıl)
- Takip Süreleri	:	3 – 36 ay (ort. takip 20.7 ± 4.8 ay)

PCNA ve Ki-67 ile tümör hücrelerinde kırmızı-kahverengi granüler nükleer boyanma izlenmiştir (Resim 1-6). PCNA ve Ki-67 (+) hücreler daha çok papiller yapıların bazal kısmında lokalize olarak izlenmiştir.

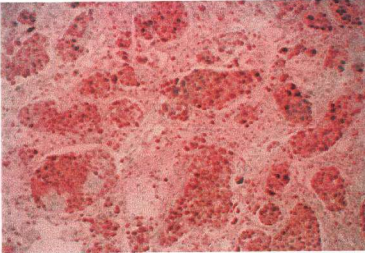
Tümör grade'i arttıkça ve hücrel atipi arttıkça NOR'ların nükleus içinde çok sayıda ve dağınık olarak bulunduğu izlendi. Grade azaldıkça NOR'lar da daha az sayıda ve gruplar halinde görülmüştür (Resim 7-8).



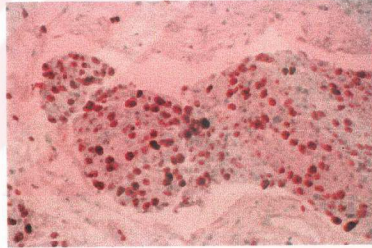
Resim 1. Düşük grade'li mesane tümöründe PCNA ile nükleer boyanma (x100).



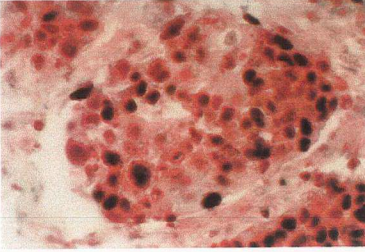
Resim 2. Düşük grade'li papiller mesane tümöründe Ki-67 boyanan tümör hücreleri (x50).



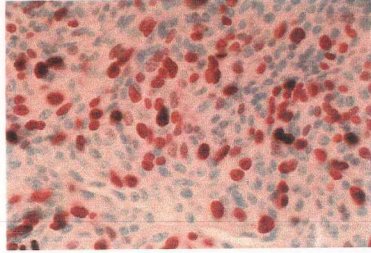
Resim 3. Yüksek gradeli invaziv mesane tümöründe PCNA boyanması (x20).



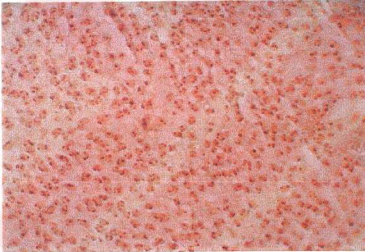
Resim 4. Yüksek grade'li invaziv mesane tümöründe Ki-67 ile boyanan tümör hücreleri (x50).



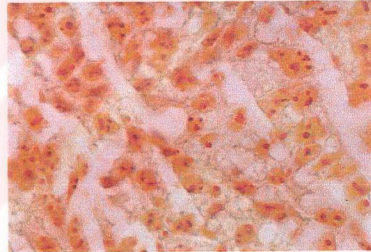
Resim 5. Mesane tümörlü hücrelerde PCNA ile nükleer kahverengi – kırmızı boyanma (x100).



Resim 6. Ki-67 ile nükleer boyanma gösteren mesane tümörü hücreleri (x20).



Resim 7. Mesane tümörü hücrelerinde AgNOR boyanması (x500).



Resim 8. Mesane tümörlü hücre nükleusları içinde gümüşle boyanan NOR'ların yakından görünümü (x1000, immersiyon).

Mesane tümörlü hastaların hepsinin evre ve grade'i belirlenerek, her evre ve grade için PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri hesaplanmış ve ortalama değerleri karşılaştırılmıştır.

PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri ile evre ve grade arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p<0.001$).

Hastaların evre-grade ilişkisi incelendiğinde; evre arttıkça grade'in de anlamlı olarak artış gösterdiği saptanmıştır ($r=0.616$, $p<0.001$).

Evre ile PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri incelendiğinde; evre arttıkça PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerlerinin anlamlı olarak arttığı görülmüştür ($r=0.645$, $p<0.001$; $r=0.634$, $p<0.001$; $r=0.522$, $p<0.001$) (Tablo 3).

Tablo 3. Mesane tümörlü hastalarda evrelere göre PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri

Evre	n	%	PCNA İndeksi (Ort.±SD)	Ki-67 indeksi Ort.±SD	AgNOR değeri Ort.±SD
T _a	25	32.5	23.26 ± 5.86	18.02 ± 6.03	2.72±0.53
T ₁	18	23.3	38.23 ± 11.41	31.56±10.76	3.47±0.50
T ₂	15	19.5	42.47 ± 13.31	34.72±12.02	3.51±0.73
T _{3a}	11	14.3	43.22 ± 13.31	37.22±11.30	3.62±1.03
T _{3b}	5	6.5	45.52 ± 8.36	37.22 ± 6.81	3.82±1.06
T _{4a}	2	2.6	57.80 ± 1.55	48.20 ± 4.24	4.76±0.01
T _{4b}	1	1.3	62.80	49.9	4.89
Toplam	77	100			

Grade, PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri arttıkça anlamlı olarak artmaktadır ($r=0.880$, $p<0.001$; $r=0.875$, $p<0.001$; $r=0.777$, $p<0.001$) (Tablo 4).

Tablo 4. Mesane tümörlü hastalarda grade'lere göre PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri

Grade	n	%	PCNA İndeksi (Ort.±SD)	Ki-67 indeksi Ort.±SD	AgNOR değeri Ort.±SD
I	15	19.5	21.21±6.49	16.06±6.41	2.60±0.45
II	39	50.6	31.35±6.11	25.23±5.29	3.11±0.61
III	15	19.5	51.36±7.81	44.14±6.47	4.01±0.79
IV	8	10.4	59.65±2.50	49.72±4.15	4.53±0.34
Toplam	77	100			

Kontrol grubu ile ayrı ayrı T_a ve grade I tümörlerin PCNA; Ki-67 indeksleri ve AgNOR değeri karşılaştırılmıştır.

Kontrol grubu ile T_a evresindeki tümörlerin PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri incelendiğinde; T_a tümörlerin PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri, kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Grade I tümörlerin PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olarak bulunmuştur ($p<0.001$) (Tablo 5).

Tablo 5. Kontrol grubu ile T_a ve grade I tümörlerin PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerlerinin karşılaştırılması

Grup	n	PCNA İndeksi Ort±SD	Ki-67 İndeksi Ort±SD	AgNOR Değeri Ort±SD
Kontrol	13	2.24±0.43	1.69±0.47	1.67±0.28
T _a	25	23.26±5.86	18.02±6.03	2.72±0.53
Grade I	15	21.21±6.49	16.06±6.41	2.60±0.45

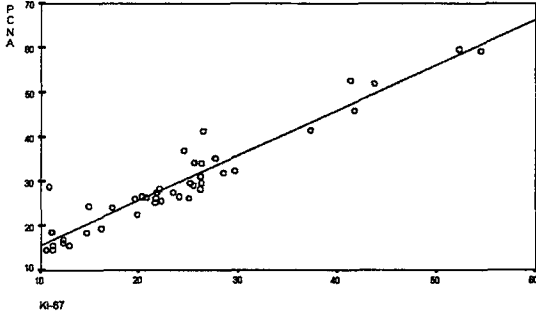
Hastalar, yüzeysel tümörlü olanlar (T_a, T₁) ve invaziv tümörlü olanlar (T₂, T₃, T₄) şeklinde iki gruba ayrılarak her grup için PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri karşılaştırılmıştır.

Yüzeysel ve invaziv tümörlerde PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri incelendiğinde; invaziv tümörlerde PCNA (p<0.001), Ki-67 (p<0.001) indeksleri ve AgNOR (p<0.01) değerleri, yüzeysel tümörlerden anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Tablo 6).

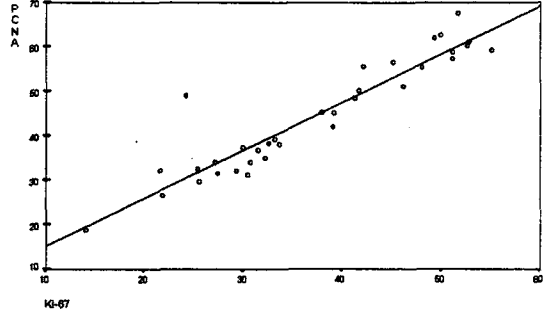
Tablo 6. Yüzeysel ve invaziv tümörlerde PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerlerinin karşılaştırılması

Grup	n	%	PCNA İndeksi (Ort.±SD)	Ki-67 indeksi Ort.±SD	AgNOR Değeri Ort.±SD
Yüzeysel tm	43	55.8	29.53±11.32	23.69±10.64	3.03±0.63
İnvaziv tm	34	45.2	44.66±12.68	37.24±11.01	3.72±0.93

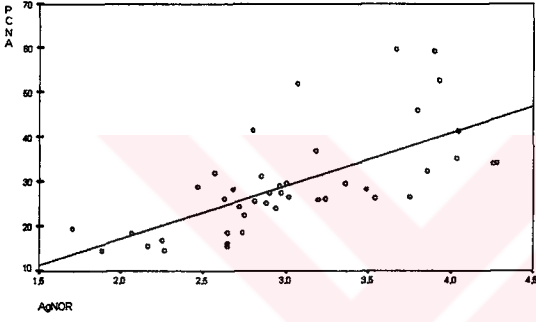
Yüzeysel (<T₂) – invaziv (≥T₂) ve düşük grade (<III) – yüksek grade (≥III) mesane tümörlerindeki PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri arasındaki ilişkiler gösterilmiştir (Şekil 2-13). Burada hepsi arasında doğrusal ilişki izlenmektedir. Parametrelerin biri arttıkça diğeri de artmaktadır.



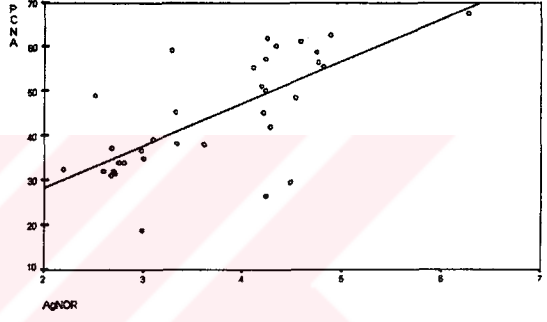
Şekil 2. Yüzeyel mesane tümörlerinde (<T2) PCNA ile Ki-67 indekslerinin ilişkisi



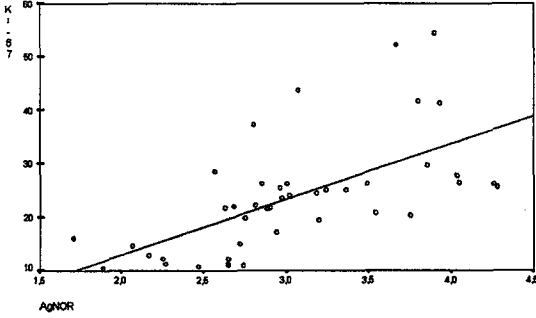
Şekil 3. İnvaziv mesane tümörlerinde (≥T2) PCNA ile Ki-67 indekslerinin ilişkisi



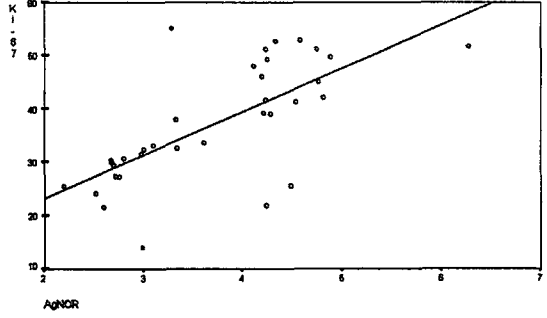
Şekil 4. Yüzeyel mesane tümörlerinde (<T2) PCNA indeksleri ile AgNOR değerlerinin ilişkisi



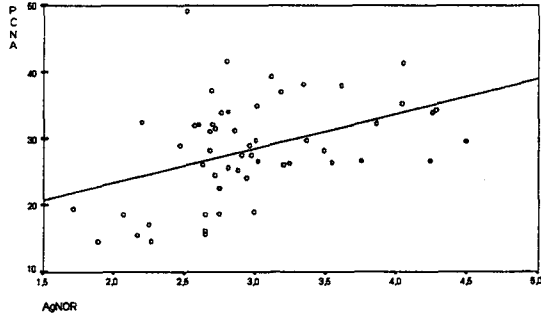
Şekil 5. İnvaziv mesane tümörlerinde (≥T2) PCNA indeksleri ile AgNOR değerlerinin ilişkisi



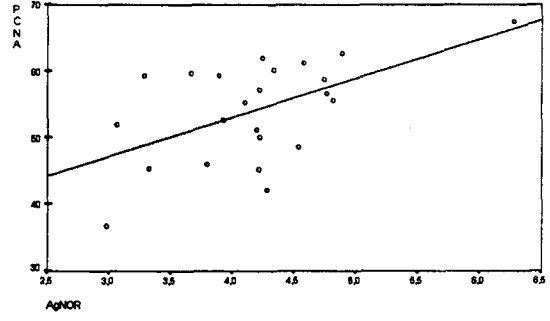
Şekil 6. Yüzeyel mesane tümörlerinde (<T2) Ki-67 indeksleri ile AgNOR değerlerinin ilişkisi



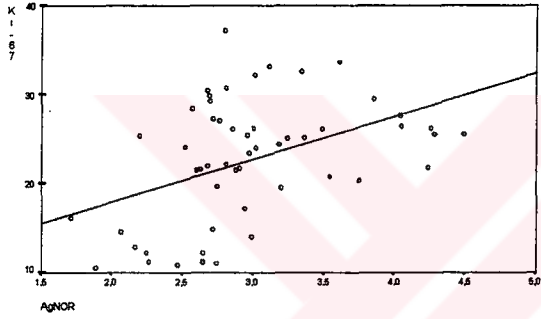
Şekil 7. İnvaziv mesane tümörlerinde (≥T2) Ki-67 indeksleri ile AgNOR değerlerinin ilişkisi



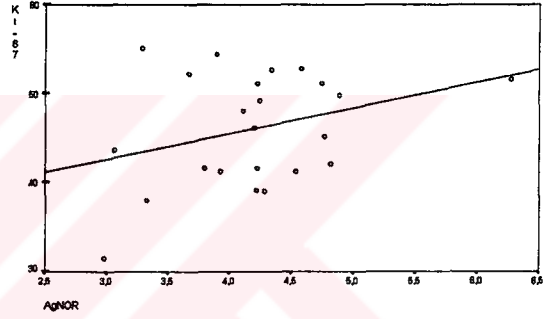
Şekil 8. Düşük grade'li mesane tümörlerinde (grade <III) PCNA indeksleri ile AgNOR değerlerinin ilişkisi



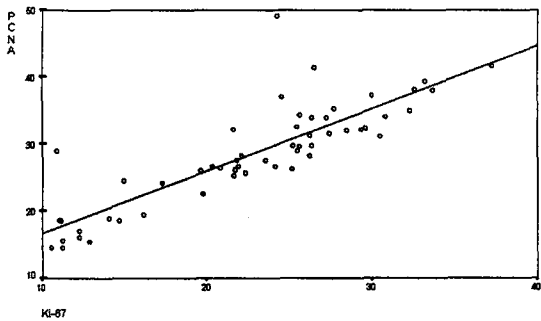
Şekil 9. Yüksek grade'li mesane tümörlerinde (grade ≥III) PCNA indeksleri ile AgNOR değerlerinin ilişkisi



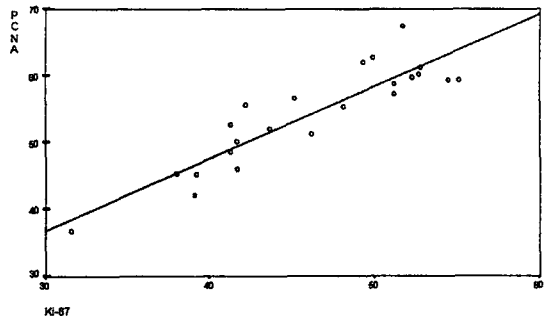
Şekil 10. Düşük grade'li mesane tümörlerinde (grade <III) Ki-67 indeksleri ile AgNOR değerlerinin ilişkisi



Şekil 11. Yüksek grade'li mesane tümörlerinde (grade ≥III) Ki-67 indeksleri ile AgNOR değerlerinin ilişkisi



Şekil 12. Düşük grade'li mesane tümörlerinde (grade <III) PCNA ile Ki-67 indekslerinin ilişkisi



Şekil 13. Yüksek grade'li mesane tümörlerinde (grade ≥III) PCNA ile Ki-67 indekslerinin ilişkisi

T_a ve T₁ grubu tümörü olan hastaların hepsine TUR yapılmış, bu hastaların 11'i TUR sonrası izlem protokolüne alınırken 32 tanesine intravezikal BCG tedavisi verilmiştir. Bu hasta grubunun takibinde tümörsüz olan ve nüks edenlerde PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri hesaplanarak karşılaştırılmıştır.

Yüzeyel tümörlerde tedavi sonrası takiplerde nüks edenlerdeki PCNA ve Ki-67 indeksleri tümörsüz olanlardan anlamlı olarak yüksek bulunurken ($p<0.01$), AgNOR değerleri arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 7).

Tablo 7. Yüzeyel tümörlerde tümörsüz ve nüks eden vakalarda PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri

Yüzeyel Tm	n	%	PCNA İndeksi (Ort.±SD)	Ki-67 indeksi Ort.±SD	AgNOR değeri Ort.±SD
Tümörsüz	31	72.1	26.30±8.39	20.35±7.89	2.93±0.64
Nüks	12	27.9	37.87±13.85	32.30±12.27	3.29±0.55
Toplam	43	100			

TUR+İzlem protokolü uygulanan hastalardan nüks edenler ve tümörsüz olanların PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 8).

TUR+BCG tedavisi uygulanan hastaların nüks edenlerindeki PCNA ($p<0.01$) ve Ki-67 ($p<0.001$) indeksleri, tümörsüz olanlara göre anlamlı derecede yüksek gözlenirken; AgNOR değeri daha az anlamlı bulunmuştur ($p=0.05$) (Tablo 8).

Tablo 8. Yüzeyel tümörlerde TUR+izlem ve TUR+BCG protokolü uygulananlarda, tümörsüz ve nüks eden vakaların PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri

Tedavi		n	PCNA indeksi Ort±SD	Ki-67 indeksi Ort±SD	AgNOR değeri Ort±SD
TUR + İzlem	Tümörsüz	7	19.20±5.39	14.42±4.53	2.38±0.30
	Nüks	4	25.46±2.57	21.10±1.12	2.76±0.13
TUR + BCG	Tümörsüz	24	26.96±7.69	20.50±10.61	3.00±0.65
	Nüks	8	40.75±13.9	35.07±12.45	3.52±0.54

TUR+BCG protokolü uygulanan hastalarda, nüks eden ve tümörsüz olanlarda PCNA ve Ki-67 indeksleri anlamlı derecede farklılık gösterdiği için bu hasta grubunda PCNA ve Ki-67 için eşik değerleri hesaplanmıştır. Bunlar için pozitif tahmini değer (positive predictive value: ppv) ve negatif tahmini değer (negative predictive value: npv) hesaplanmıştır. Bu eşik değerler ile hangi hastaların tedaviye yanıt verdiği hangi hastaların ise yanıt vermediği belirlenmiştir (Tablo 9).

Tablo 9. TUR+BCG uygulananlarda PCNA ve Ki-67 için eşik değerler, spesifite, sensitivite, ppv ve npv değerleri

	Eşik Değer	Spesifite (%)	Sensitivite (%)	ppv (%)	npv (%)
PCNA indeksi	29.00	70.8	87.5	50	94.4
Ki-67 indeksi	26.00	79.2	87.5	58.3	95.0

İnvaziv mesane tümörü olan 22 hastaya indüksiyon veya neoadjuvan amaçlı M-VEC kemoterapisi verilmiş; bunların 6'sında remisyon, 3'ünde stabil hastalık ve 13'ünde progresyon görülmüştür. Bu hasta grubunda, her grup için PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri hesaplanmış ve Tablo 10'da özetlenmiştir.

Tablo 10. M-VEC kemoterapi verilen hasta grubunda remisyon, stabil hastalık ve progresyona göre PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri

Tedaviye Yanıt	n	%	PCNA İndeksi (Ort.±SD)	Ki-67 indeksi Ort.±SD	AgNOR değeri Ort.±SD
Remisyon	6	27.2	32.45±1.96	28.36±4.01	3.04±0.72
Stabil hastalık	3	13.6	36.96±2.67	30.13±3.00	3.35±0.22
Progresyon	13	59.2	55.40±7.32	47.56±5.74	4.34±0.72
Toplam	22	100			

Kemoterapi sonrası remisyon gösteren ya da stabil kalan yani kemoterapiye cevap veren hastalarla, progresyon gösteren yani kemoterapiye cevap vermeyen hastaların PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri karşılaştırılmıştır.

Kemoterapiye yanıt veren (remisyon / stabil hastalık) grup ile yanıt vermeyen (progresyon) gruptaki hastaların PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri incelendiğinde; progresyon gösteren grubun PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri, yanıt verenlerden daha yüksek ve anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$) (Tablo 11).

Tablo 11. Remisyona giren ya da stabil kalan hastalar (kemoterapiye cevap veren) ile progresyon gösteren (kemoterapiye cevap vermeyen) hastaların PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerlerinin karşılaştırılması

Tedaviye Yanıt	n	%	PCNA İndeksi (Ort.±SD)	Ki-67 indeksi Ort.±SD	AgNOR değeri Ort.±SD
Remisyon / Stabil	9	40.8	33.95±3.05	28.95±3.61	3.25±0.58
Progresyon	13	59.2	55.40±5.74	47.56±5.74	4.34±0.72
Toplam	22	100			

Kemoterapi verilen hastalarda, kemoterapiye cevabı predikte edebilecek birer eşik değer aranmış; PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR için eşik değerler hesaplanmıştır. Bu eşik değerler için spesifite, sensitivite, pozitif tahmini değer (ppv) ve negatif tahmini değer (npv) bulunmuştur (Tablo 12). Bu şekilde hangi hasta grubunun kemoterapiye yanıt vereceği; hangi grubun ise progresyon göstereceği belirlenmeye çalışılmıştır.

Tablo 12. Kemoterapi uygulanan hastalarda PCNA, Ki-67 ve AgNOR için eşik değerler, spesifite, sensitivite, ppv ve npv değerleri

	Eşik Değer	Spesifite (%)	Sensitivite (%)	ppv (%)	npv (%)
PCNA indeksi	40.00	89	90	90	75
Ki-67 indeksi	35.00	92	95	95	78
AgNOR değeri	3.20	88.9	89	88	70

Bu çalışmada grade, evre, PCNA indeksi, Ki-67 indeksi ve AgNOR değerinin prognoz ile doğrudan ilişkili olduğu gözlenmektedir. Ayrıca tüm

parametreler için lojistik regresyon testi yapıldığında, tümör grade'inin tek başına bağımsız bir prognostik parametre olduğu görülmüştür. Tümör boyutu ve sayısı ile PCNA, Ki-67 indekslerinin ve AgNOR değerlerinin istatistiksel olarak değeri yoktur ($p>0.05$).



V- TARTIŞMA

Mesane tümörlü hastalarda, prognoz ve tedaviye yanıtı değerlendirmek amacıyla birçok çalışmalar yapılmış; grade ve evre başta olmak üzere tümör tipi, sayısı, boyutu, vasküler invazyon varlığı, in situ karsinoma varlığı gibi birçok prognostik parametre değerlendirilmiştir (60, 61, 62). Bu parametrelerin hepsinin önemli bir yeri olmasına rağmen; bazı hasta gruplarında klinik gidiş ve tedaviye yanıt net olarak ortaya konamamaktadır. Heterojen yapı gösteren bu grupta, mesane tümörü değişik biyolojik davranışlar göstermektedir (16). Bu nedenle son 20 yıl içerisinde, mesane tümörlerinin grade ve evre gibi klasik prognostik parametrelere ek olarak tümör hücresinin proliferasyon indeksinin hesaplanması gündeme gelmiştir (27).

Neoplastik lezyonlarda, proliferatif hücre oranının tümörün karakterinde çok büyük role sahip olduğu öğrenilmiştir. Bu olay, birçok örneklerde olduğu gibi tümör nüksü ve metastaz potansiyelinin proliferatif aktiviteyle ilişkili olduğu esasına dayanır (13, 63).

Mesane tümörlerinin proliferatif aktivitesini belirlemek amacıyla morfometrik, sitokemikal ve immünohistokimyasal belirleyiciler kullanılmıştır (27, 64, 65, 66). İmmünohistokimyasal olarak proliferasyon indeksinin hesaplanması hem kolay, hem ucuz, hem de daha güvenilirdir. Çünkü aynı parafin kesit ile çalışmaya olanak sağlar.

Bu amaçla kullanılan PCNA ilk kez 1978 yılında Miyachi ve arkadaşları tarafından sistemik lupus eritematozuslu bir hastanın otoimmün serumundan elde edilmiştir (46). Smetana ve arkadaşları 1983 yılında PCNA'nın hematolojik malignitelerde de kullanılabilecek bir marker olduğunu göstermişlerdir (67).

Daha sonra gastrointestinal sistem, meme, cilt, akciğer, üriner sistem ve genital sistem gibi birçok sistemin malign tümörlerinde proliferasyon marker'i olarak kullanılmıştır (24). Son yıllarda rutin olarak tesbit edilmiş ve parafine gömülmüş dokulardaki PCNA'yi tanıyan bir monoklonal antikor olan PC-10 kullanıma girmiştir (68).

Proliferasyon indeksinin hesaplanmasında kullanılan diğer antikor Ki-67'dir. İlk defa 1983 yılında Gerdes ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olup, Hodgkin hastalığında L428 hücre fraksiyonuna karşı bulunmuştur (38). Antikor Almanya'nın Kiel şehrinde üretildiği ve 67. hücre kültüründe en iyi oluştuğu için bu adı almıştır. Daha sonra lenfoproliferatif hastalıklarda, santral sinir sistemi tümörlerinde, yumuşak doku tümörlerinde, meme kanserinde, genitoüriner, gastrointestinal sistem ve cilt tümörlerinde çalışılmıştır (25).

Hücre proliferasyonunu değerlendirmede kullanılan bir diğer yöntem AgNOR yöntemidir. İlk kez 1972 yılında saptanmıştır. NOR'lar hücre nükleusunda bulunan ribozomal DNA'daki looplardır. Protein sentezinde hayati önem taşır. Klinik kullanımı ilk kez malign ve benign hücre arasındaki farkı saptama amacıyla yapılmış ve anlamlı fark gözlenmiştir (55). Böylece AgNOR sayısına bakarak tümör tanısı konulmuştur. Son yıllarda tümörlerin prognostik parametrelerle olan ilişkilerini belirlemede kullanılmıştır (57, 69).

1990 yılında Woods ve arkadaşları, PCNA'nın gastrointestinal lenfomalarda prognostik değeri olduğunu göstermişlerdir (70). Yine Jain ve arkadaşları mide kanserlerinde kötü prognoz gösteren vakaların PCNA değerlerinin de yüksek olduğunu saptamışlardır (71). Yapılan çalışmalar sonucunda PCNA'nın proliferasyon marker'i olarak kullanımı yaygınlık

kazanmıştır. Ki-67, 1983 yılında Gerdes tarafından bulunduğundan sonra lenfoproliferatif hastalıklarda prognostik parametre olarak kullanılmaya başlanmıştır (38, 72). Yaptıkları çalışmada Ki-67 indeksi yükseldikçe hastaların prognozu kötüleşmiş; evre ve grade arttıkça Ki-67 indeksleri artış göstermiştir. Ki-67 ile ilgili aynı sonuçlar Zuber ve arkadaşları tarafından merkezi sinir sistemi tümörlerinde, Vollmer ve arkadaşları tarafından kemik tümörlerinde, Bouzubar ve arkadaşları tarafından ise meme kanserlerinde gösterilmiştir (73, 74, 75).

Hücre proliferasyonunu değerlendirmede kullanılan diğer yöntem AgNOR boyaması olup, ilk kez 1972 yılında bulunmuştur. Bugünkü anlamı ile AgNOR yöntemi interfazik hücrelere ilk olarak 1986 yılında Ploton ve arkadaşların tarafından uygulandı. Bu çalışmada benign ve malign hücreler arasında ortalama AgNOR sayısı açısından belirgin bir fark olduğu, bu farka dayanılarak tümör ayrımının yapılabileceği belirtildi (55). Son çalışmalarda NOR sayısına sadece hücre proliferasyonunu değil aynı zamanda transkripsiyonel aktivite, rRNA gen amplifikasyonu gibi tümör yapılarını da yansıtmaktadır (69).

Son 15 yıl içerisinde hücre kinetiği, immün sistem ve genetik alanındaki ilerlemelerle birlikte, tümör oluşumu ve prognozu hakkındaki çalışmalara hız verilmiştir. Bu gelişmeler mesane tümörlerindeki çalışmalara da yansımış ve hücre kinetiği ile grade ve evre arasındaki ilişkiyi aydınlatmak amaçlı birçok çalışmalar yapılmıştır (23, 32, 64).

Bu çalışmalarda, proliferasyon marker'ları tek tek veya kombine çalışılıp mesane tümörlerinin prognozu hakkında yorumlar yapılmıştır. Skopelitou ve arkadaşları 1990 yılında yaptıkları çalışmada, mesane tümörlü hastalarda PCNA ve AgNOR değerlerini incelemişlerdir (76). 50 hastayı içeren çalışmada

grade arttıkça PCNA ve AgNOR skorlarının arttığını ve prognostik olarak çok değerli marker'lar olduğunu bildirmişlerdir. Mazerolles ve arkadaşları 80 mesane tümörlü hastada Ki-67'nin MIB-1 monoklonal antikorunu kullanmış, tümör evresi ve grade'i yükseldikçe Ki-67 indeksinin de doğru orantılı olarak yükseldiğini göstermişlerdir (45). Daha sonra 1995 yılında Krüger ve arkadaşları 58 mesane tümörlü hastada morfometri ile beraber NOR, PCNA ve Ki-67 indekslerini karşılaştırmıştır (77). Bu çalışmada tümör grubunun NOR, PCNA ve Ki-67 değerleri, kontrol grubundan yüksek bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada evre ve grade arttıkça NOR, PCNA ve Ki-67 değerleri de artış göstermiştir. Son 2 yıl içinde yapılan çalışmalarla PCNA ve Ki-67'nin, diğer prognostik parametrelerle beraber mesane tümörlerinin prognozunu belirlemede çok önemli yer tuttuğunu gösteren yayınlar artmıştır (78, 79, 80, 81).

Tez konusu olan prospektif çalışmada, mesane değişici epitel kanseri saptanan, hastalarda PCNA, Ki-67 ve AgNOR incelemeleri yapılmıştır.

Sonuçlar incelendiğinde; kontrol grubu hastaların PCNA, Ki-67 ve AgNOR değerleri T_a tümörlerin değerlerinden belirgin derecede düşük bulunmuştur. Kontrol grubu ile grade I tümörlerin PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri karşılaştırıldığında da aynı sonuçla karşılaşılmaktadır. Bu sonuçlardan hareketle, çalışmadan öncelikle çıkarılması gereken sonuç, mesane kanserli hastalardaki PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerlerinin normal mesane dokusundan belirgin derecede yüksek olduğudur. Bu nedenle, tanı güçlüğü olan vakalarda PCNA, Ki-67 ve AgNOR boyamaları tanıya yardımcı olabilecek bir yöntem olarak kabul edilebilir. Krüger ve arkadaşları da bizim çalışmamızdaki sonuca paralel bulgular saptamıştır (77).

Mesane tümörlerinde, tümör evresi önemli bir prognostik parametredir. Çalışmamızda, tümör evresi arttıkça buna paralel olarak PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri de artış göstermektedir. Hastalar, yüzeysel ($<T_2$) ve invaziv ($\geq T_2$) olarak sınıflandırıldığında, invaziv tümörlerde PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri anlamlı derecede yüksek bulunmaktadır. Çalışmadan çıkarılabilecek ikinci sonuç mesane tümörlerinde evre arttıkça, PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerlerinin de yükseldiğidir. Özellikle invaziv tümörlerde bu artış daha göze çarpıcı olarak karşımıza çıkmaktadır. Elde edilen bu bulguya dayanılarak, yüksek proliferatif indekse sahip mesane tümörlerinin daha invaziv seyrettiği yorumu yapılabilir. Elde edilen bu bulgular literatür ile paralellik göstermektedir (76).

Mesane tümörlerinde diğer önemli bir parametre tümör grade'idir. Çalışmamızda tümör grade'i arttıkça PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri de doğru orantılı olarak artış göstermiştir. Tümör grade'i arttıkça proliferatif aktivitesi de artmaktadır. Okamura ve arkadaşları çalışmalarında mesane tümörlerinin grade ve evresi ile Ki-67 indeksleri arasında orta derecede ilişki bulmuşlardır (82). Bizim çalışmamızda da grade ve evre arasında anlamlı ilişki olup, evre-grade arttıkça PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri artmaktadır. Mansour ve arkadaşları mesane kanserlerinde NOR sayısının değerli olmadığını belirtmiştir (83). Bizim bulgularımız ise bunun aksine, literatürdeki diğer yayınlara benzer bulunmuştur (27).

Bu sonuçlar, proliferasyon marker'larının, zaman zaman subjektif bir değerlendirme olarak görülebilen tümör grade'lemesini daha objektif hale getirebilecek bir yöntem olabileceğini düşündürmektedir.

Mesane tümörleri sık nüks gösterme eğiliminde olan tümörlerdir. Yüzeyel tümörler incelendiğinde; tedaviye rağmen hangi tümörün nüks edeceğinin belirlenmesi önemli bir sorundur. Tümörün evre ve grade'ine bakarak prognoz hakkında yorum yapılabilmesine rağmen aynı evre ve grade'de olup nüks açısından yorum yapılamayan vakalar da mevcuttur. Bu nedenle grade ve evreye bakılarak tümörün nüks edip edemeyeceği hakkında her zaman doğru bir tahminde bulunmak mümkün olmamaktadır.

Bizim çalışmamızda, yüzeyel mesane tümörü olan 43 vaka değerlendirilmiş ve takiplerde nüks edenlerde PCNA ve Ki-67 indeksleri tümörsüz olanlardan daha yüksek bulunurken AgNOR değerleri arasında fark izlenmemiştir. Bu bulgu PCNA ve Ki-67 için literatür bulguları ile uyumlu iken, AgNOR için farklı bir sonuç elde edilmiştir (80, 81). Bu sonuçlar, yüzeyel mesane tümörü olan hastalarda PCNA ve Ki-67 indeksleri bulunarak, buna göre tümörün nüks etme riskinin tahmin edilebileceğini telkin etmektedir.

Yüzeyel mesane tümürlü hastalarda aydınlanmamış noktalardan biri de "hangi hasta grubunun izleme alınması?" ve "hangi hasta grubuna daha agresif tedavi yaklaşımlarında bulunulması gerektiği?"dir. Çalışmamızda 11 hasta TUR+izlem protokolüne alınmış, bu hastaların 4'ü nüks etmiştir. Nüks eden vakalarda PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri tümörsüz takip edilenlerden yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu hasta grubunu tek başına ele aldığımızda, nüks eden vakalar için yorum yapmamız güçtür.

Çalışmamızda 32 hastaya TUR+intravezikal BCG tedavisi uygulanmış ve bu hasta grubunda nüks edenler ve tümörsüz olanlarda PCNA, Ki-67 ve

AgNOR'un değeri araştırılmıştır. Bu hasta grubunda 8 vakada nüks görülmüş ve nüks eden vakalarda PCNA, Ki-67 indeksleri tümörsüz olanlara göre anlamlı derecede yüksek bulunurken; AgNOR değeri daha az anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.05$). Bu bulgulara göre PCNA ve Ki-67 indeksi yüksek olan hastalarda TUR+intravezikal BCG tedavisi sonrası nüks riskinin fazla olacağı öngörülebilir.

TUR+intravezikal BCG uygulanan hastalar için PCNA, Ki-67 ve AgNOR sonuçlarının yeni bir kriter olup olmayacağına dair literatürde yeterli bir bilgi yoktur. Bu hasta grubunun hangisinin kötü seyredeceği, hangisinin remisyon göstereceği bilinmemektedir. Bu amaçla, bu hasta grubunun hangisinin tedaviye yanıt verebileceği, hangisinin ise agresif davranacağını yorumlayabilmek için PCNA ve Ki-67 için eşik değer, spesifite, sensitivite, pozitif tahmini değer (ppv) ve negatif tahmini değer (npv) elde edilmiştir.

PCNA için eşik değer 29 olarak seçilirse, spesifite % 70.8, sensitivite % 87.5, ppv % 50 ve npv ise % 94.4 olacaktır. Yani PCNA değeri 29 ve altında olan 100 hastaya intravezikal BCG verildiğinde, bunların 94'ünde tedavi sağlanacak, 6'sı nüks edecektir. Böylece % 94 hastaya doğru davranılmış olunacaktır. Eğer bu hasta grubundan PCNA değeri 29'un üzerinde olan 100 kişiye intravezikal BCG verilirse, bunların 50'si nüks edecek, 50'si için doğru davranılmış olunacaktır. Burada eşik değer belirlenmesinin nedeni gereksiz tedavi oranını düşürmek ve daha agresif tedavi gerektiren hastaları önceden belirleyerek vakit kaybetmemektir.

Ki-67 için eşik değer 26 olarak seçilirse, spesifite % 79.2, sensitivite % 87.5, ppv % 58.3, npv ise % 95 olacaktır. Yani Ki-67 değeri 26 ve altında olan

100 hastaya intravezikal BCG verildiğinde, bunların 95'inde tedavi sağlanacak, 5'i nüks edecektir. Eğer bu hasta grubundan Ki-67 değeri 26'nın üzerinde olan 100 kişiye intravezikal BCG verilirse, bunların 58'i nüks edecek, 42'si için doğru davranılmış olunacaktır.

Yüzeyel tümörlü hastalarda intravezikal BCG tedavisi öncesi PCNA ve Ki-67 için eşik değerler, spesifite, sensitivite, ppv ve npv değerlerinin gözönünde tutulması hem gereksiz tedaviyi ortadan kaldıracak hem de vakit kaybetmeden daha radikal tedavi yöntemlerine yönelmeyi sağlayacaktır.

Tez çalışmamızda PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri çalışılan diğer grup invaziv mesane tümörleri ($\geq T_2$)dir. Bu vakalardan 22'sine indüksiyon veya neoadjuvan amaçlı sistemik M-VEC kemoterapi verilmiştir. Bilindiği gibi, infiltran mesane tümörlerinde sistemik kemoterapi planlanan hastalarda, kemoterapiye olan yanıtı predikte edebilmek için en iyi prognostik parametreler tümör grade'i, tümör penetrasyon derinliği, lenfatik invazyon, tümör büyüklüğü, multifokalite, papiller veya solid konfigürasyon varlığı ve tümör rekürrens sıklığıdır (62, 84). Literatürde mesane tümörlerinde kemoterapiye yanıt ile PCNA , Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerlerinin ilişkisine dair yeterli bilgi yoktur.

M-VEC kemoterapi verilen 22 olgu incelenmiş; progresyon gösteren vakaların PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri stabil hastalık ve remisyon olarak izlenenlerden daha yüksek, stabil hastalık olarak izlenenlerin değerleri de remisyon olarak izlenenlerden daha yüksek bulunmuştur. Kemoterapiye yanıt veren (remisyon/stabil hastalık) ve kemoterapiye yanıt vermeyen (progresyon) grupta PCNA, Ki-67 ve AgNOR için eşik değer, spesifite, sensitivite, ppv ve npv değerleri hesaplanmıştır.

PCNA için eşik değeri 40 olarak seçilirse, spesifite % 89, sensitivite % 90, ppv % 90 ve npv % 75 olacaktır. Yani bu hastaların PCNA değeri 40 ve altında olanlarının 100'üne kemoterapi verildiğinde 75'i yanıt verecek, 25'inde progresyon görülecektir. Bu durumda 25 hasta gereksiz tedavi almış olacaktır. Eğer PCNA değeri 40'ın üzerinde olan 100 hastaya kemoterapi verilirse, bunların 90'ı progresyon gösterecek ve ancak 10 hastaya doğru davranılmış olunacaktır.

Ki-67 için eşik değeri 35 olarak alınırsa, spesifite % 92, sensitivite % 95, ppv % 95 ve npv ise % 78 olacaktır. Bu hasta grubunda Ki-67 değeri 35 ve altında olan 100 kişiye kemoterapi verildiğinde 78'inde cevap alınacak, 22'sinde progresyon görülecektir. Ki-67 değeri 35'in üzerinde olan 100 kişiye kemoterapi verildiğinde 95'inde progresyon görülecek ve sadece 5'i için doğru davranılmış olunacaktır.

AgNOR için eşik değeri 3.2 alındığında, spesifite % 88.9, sensitivite % 89, ppv % 88 ve npv ise % 70 olacaktır. Bu hasta grubunda AgNOR değeri 3.2 ve altında olan 100 kişiye kemoterapi verildiğinde 70'inde cevap alınacak ve 30'u progresyon gösterecektir. Eğer AgNOR değeri 3.2'in üzerinde olan 100 hastaya kemoterapi verilecek olursa, 88'i progresyon gösterecek ve 12'sine doğru davranılmış olunacaktır.

Daha önce de bahsedildiği gibi, PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri ile kemoterapiye yanıt arasındaki ilişkiyi aydınlatmaya yönelik yeterli çalışma ve bilgi mevcut değildir. Neoadjuvan kemoterapi planlanan hasta grubunda eşik değerler göz önünde bulundurularak tedaviye yanıt hakkında fikir sahibi olunacak ve gereksiz tedavi uygulamalarından kaçınılacaktır.

IV. SONUÇLAR

1. Mesane tümörlerinde evre ve grade yükseldikçe PCNA, Ki-67 ve AgNOR düzeyleri artmaktadır. Bu nedenle PCNA, Ki-67 ve AgNOR mesane tümörlerinde grade'lemeye ek olarak daha objektif bir histopatolojik sınıflama getirebilir.
2. İnvaziv tümörlerde PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri yüzeysel tümörlerden daha yüksek düzeydedir.
3. Yüzeysel tümörlü hastalardan TUR sonrası takiplerde nüks görülenlerde, PCNA ve Ki-67 indeksleri tümörsüz olarak takip edilenlerden daha yüksek bulunmaktadır.
4. TUR + izlem protokolü uygulanan yüzeysel tümörlü hastalarda, nüks görülenlerin PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri ile tümörsüz takip edilenlerin değerleri arasında anlamlı fark izlenmemiştir.
5. TUR+BCG protokolü uygulanan ve nüks eden hasta grubunda PCNA ve Ki-67 indeksleri, tümörsüz takip edilenlerden daha yüksektir. TUR ile tedavi edilen ve intravezikal BCG tedavisi planlanan hastalarda TUR materyalinde PCNA ve Ki-67 immünohistokimyasal boyaması yapılarak eşik değerlerin hesaplanması ve buna göre strateji belirlenmesi daha etkin tedavi olanağı sağlayacaktır.
6. İnvaziv mesane tümörü olan ve sistemik kemoterapi verilen hasta grubunda, kemoterapiye yanıt vermeyen hastalarda PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri, yanıt verenlerden daha yüksek bulunmuştur. Özellikle neoadjuvan kemoterapi planlanan hastalarda PCNA, Ki-67 ve AgNOR için

eşik değerlerin hesaplanması daha etkili ve doğru tedavi olanağı sağlayacaktır. Daha geniş serilerde ve uzun dönemli takiplerle elde edilecek eşik değerler; PCNA, Ki-67 ve AgNOR yöntemlerinin rutin klinik uygulamalarda yerini almasını sağlayacaktır.

7. PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri mesane tümörlerinde hasta prognozunu belirlemede önemli değer taşımaktadır. Bu proliferasyon marker'ları mesane tmrl hastalarda bireysel prognostik farklılıkları önceden saptamayı sağlayabilirler.



VII. ÖZET

AMAÇ: Bu çalışmanın amacı, mesane tümörlü hastalarda klinik progresyonu; intravezikal BCG veya sistemik M-VEC kemoterapisi alan hastalarda, hastaların tedaviye olan yanıtını belirlemede, PCNA, Ki-67 ve AgNOR incelemesinin prediktif bir değeri olup olmadığının ortaya konulması ve bu proliferasyon marker'ları ile evre, grade gibi klinikopatolojik parametrelerin korelasyonunun araştırılmasıdır.

HASTALAR VE YÖNTEM: Çalışma grubuna mesane tümörlü 77 hasta ve herhangi bir malignitesi olmayan 13 kontrol vakası dahil edilmiştir. Yüzeyel mesane tümörlü hastaların 32'sine TUR+intravezikal BCG uygulanmış, invaziv mesane tümörlü hastaların ise 22'sine sistemik M-VEC kemoterapisi verilmiştir. Hastalara tedavi öncesinde TUR yapılarak evre ve grade durumu ortaya konmuş; TUR materyallerinde immünohistokimyasal yöntemle PCNA, Ki-67 ve AgNOR boyamaları yapılmıştır. Bu proliferasyon marker'larının klinikopatolojik parametreler ile korelasyonu ve tedaviye olan yanıt ile ilişkisi araştırılmıştır.

BULGULAR: Evre ile grade arttıkça PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri artış göstermiştir ($p<0.001$). Kontrol grubu ile tümörlü hastaların PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri karşılaştırıldığında, tümörlü hastalarda belirgin yükseklik bulunmuştur ($p<0.001$).

Yine invaziv tümörlerde PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri, yüzeyel tümörlerden daha yüksek olarak bulunmuştur ($p<0.001$). Yüzeyel tümörlerde, TUR+intravezikal BCG alanlardan nüks edenlerde, tümörsüz izlenenlere göre daha yüksek PCNA ve Ki-67 indeksleri saptanmıştır ($p<0.01$ ve $p<0.001$). Bu grupta AgNOR değeri daha az anlamlıdır ($p=0.05$).

TUR+intravezikal BCG tedavisi alanlarda PCNA için eşik değer 29 (spesifite % 70.8, sensitivite % 87.5, ppv % 50, npv % 94.4), Ki-67 için eşik değer 26 (spesifite % 79.2, sensitivite % 87.5, ppv % 58.3, npv % 95) olarak hesaplanmıştır.

İnvaziv mesane tümörü olan ve sistemik M-VEC kemoterapi alan hastalarda, tedaviye yanıt vermeyenlerde, tedaviye yanıt verenlerden daha yüksek PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri elde edilmiştir ($p<0.001$). Bu hasta grubunda PCNA için eşik değer 40 (spesifite % 89, sensitivite % 90, ppv % 90, npv % 75), Ki-67 için eşik değer 35 (spesifite % 92, sensitivite % 92, ppv % 95, npv % 78) ve AgNOR için eşik değer 3.2 (spesifite % 88.9, sensitivite % 89, ppv % 88, npv % 70) olarak hesaplanmıştır.

SONUÇ: Mesane tümörlerinde PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri hesaplanarak klinik progresyon hakkında fikir yürütülebilir.

Bu hasta grubunda intravezikal BCG tedavisi veya sistemik M-VEC kemoterapisi planlandığında PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerlerine bakılarak tedaviye yanıt hakkında yorum yapılabilir. Ayrıca tedavi seçenekleri değerlendirilirken PCNA, Ki-67 indeksleri ve AgNOR değerleri yardımcı olabilir. Daha geniş serilerde ve uzun dönemli takiplerle elde edilebilecek eşik değerler; PCNA, Ki-67 ve AgNOR yöntemlerinin rutin klinik uygulamalarda yerini almasını ve tedaviye yönelik seçeneklerin değerlendirilmesinde objektif kriterler getirilmesini sağlayacaktır.

VIII. KAYNAKLAR

1. Müftüoğlu YZ: Ürogenital sistem tümörleri. Üroloji Ders Kitabı, Yaman LS, Göğüş O, Müftüoğlu YZ, Küpeli S, Anafarta K, Şafak M, Bedük Y, Arıkan N (Editörlüğünde); sayfa 331, Güneş Kitabevi, 1990.
2. Hanham IWF: Mesane tümörleri. Klinik Onkoloji, Hossfeld DK, Sherman CD, Love RR, Bosch FX (Editörlüğünde), Yaman LS (Çeviri); Sayfa 293, TC Sağlık Bakanlığı Kansere Savaş Dairesi Başkanlığı – Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Ortak Yayını, 1992.
3. Silverberg E, Boring CC, Sequres TS: Cancer Statistics 1990, CA, 40: 9, 1990.
4. Catalona WS: Urothelial tumors of the urinary tract. In Walsh PC; Retik AB, Stamey TA, Vaughan ED Ed: Campbell's Urology, Sixth edn. Philadelphia: WB Saunders, Vol 2, pp 1113, 1992.
5. Carroll PR: Urothelial carcinoma: Cancers of the bladder, urether and renal pelvis. In Tanagho EA, Mc Anninch JW Ed: Smith's General Urology, thirteenth edn. Appleton and Lange, pp 341, 1992.
6. UICC Staff et al (editors): TNM classification of Malignant Tumors, 4th ed (UICC International Union Against Cancer Series) Springer – Verlag, 1989.
7. Fradet Y: Molecular and immunologic approaches in the management of bladder cancers, Urol Clin North Am, 18 (3): 515, 1991.
8. Prout GR, Griffin PP, Shipley WV: Bladder carcinoma as a systematic disease, Cancer, 42: 2532, 1979.
9. Cummings KB: Carcinoma of the bladder: Predictors. Cancer, 45: 1849, 1980.

10. Narayan AS, Lening SS, Slyman DJ et al: Bladder Cancer: factors affecting survival, J Urol, 130: 56, 1983.
11. Whitmore WF: Toward the rational management of the bladder cancer: An overview, Urology, 31: 5, 1988.
12. Marshall VF, McCarron JP: The curability of vesical cancer: Greater now or then? Cancer Res, 37: 2753, 1977.
13. Pramod C, Sogani MD: Bladder tumors. In Seidman EJ, Hanno PM Ed: Current Urologic Therapy, Philadelphia: WB Saunders, pp 332, 1994.
14. Wijkstrom H, Edsmyr F, Lundh B: The value of preoperative classification according to the TNM system. Eur Urol, 10: 101, 1984.
15. Friedell GH, Bell JR, Burney SW et al: Histopathology and classification of urinary bladder carcinoma. Urol Clin North Am, 3: 53, 1976.
16. Melicow MM: Tumors of the bladder: A multifaceted problem. J Urol, 112: 467, 1974.
17. Kurth KH, Denis L, Bouffloux CH, Sylvester R, Debruyne FMJ et al: Factors affecting recurrence and progression in superficial bladder cancers. Eur J Cancer, 31(11): 1840, 1995.
18. Althausen AF, Prout GR Jr, Daly JJ: Noninvasive papillary carcinoma of the bladder associated with carcinoma in situ, J Urol, 116: 575, 1976.
19. Anderstrom C, Johansson S, Nilsson S: The significance of lamina propria invasion on the prognosis of patients with bladder tumors. J Urol, 124: 23, 1980.
20. Sarma DG: The role of lymphoid reaction in bladder tumors. J Urol, 104: 843, 1970.

21. Raitanen MP, Tammela TLJ: Relationship between blood groups and tumor grade, number, size, stage, recurrence and survival in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Scand J Urol Nephrol* 27: 343, 1993.
22. Kuczyk MA, Bokemeyer JS, Serth J et al: p53 Overexpression as a prognostic factor for advanced stage bladder cancer. *Eur J Cancer*, 31 (13): 2243, 1995.
23. Lipponen PK, Eskelinen MS, Nordling S: Progression and survival in transitional cell bladder cancer: a comparison of established prognostic factors, S-phase fraction and DNA ploidy. *Eur J Cancer*, 27: 877, 1991.
24. Hall PA, Levison DA, Woods AL et al: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of degranulated expression in some neoplasms. *J Pathol*, 162: 285, 1990.
25. Brown DC, Gatter KC: Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology*, 17: 489, 1990.
26. Masuda M, Nagamoto A, Hirokawa M, Takano Y, Shuin T: Nucleolar organizer regions in bladder cancer: application to urinary cytology. *Urology*, 44(2): 194., 1994.
27. Cohen BM, Waldman FM, Carroll PR et al: Comparison of five histopathological methods to assess cellular proliferation in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Hum Pathol*, 24: 772, 1993.
28. Oliver W, Jones MD. *Maternal-Fetal Medicine: Principles and Practice*, p.3, 1989.

29. Alberts B, Bray D, Lewis J, Et al: The cell division cycle. In Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD Ed: Molecular Biology of the cell, third edn. New York: Garland Pub Inc. pp.863, 1994.
30. McCormick D, Hall PA: The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology*, 21: 591, 1992.
31. Corbin BE, Ekman P, Gustafson H et al: Grading of human urothelial carcinoma based on nuclear atypia and mitotic frequency: Prognostic importance. *J Urol*, 145: 972, 1991.
32. Liponen PK, Eskelinen MJ: Volume corrected mitotic index and mitotic activity index in transitional cell bladder cancer. *Eur Urol*, 18: 258, 1990.
33. Hall PA, Levison DA: Review: Assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol*, 43: 184, 1990.
34. Meyer JS: Cell kinetic measurements of human tumors. *Hum Pathol* 13(10): 874, 1982.
35. Sahin AA, Ro JY, El-Naggar AE et al: Tumor proliferative fraction in solid malignant neoplasms. *Am J Clin Pathol*, 96: 512, 1991.
36. Tribukait B: Flow cytometry in assessing the clinical aggressiveness of genitourinary neoplasms. *World J Urol*, 5: 108, 1987.
37. Shawney N, Hall PA: Ki-67 structure, function and new antibodies. *J Pathol*, 168: 161, 1992.
38. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 31: 13, 1983.

39. Gerdes J, Lemke H, Baisch H et al: Cell analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*, 133: 1710, 1984.
40. Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M: The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol*, 133: 579, 1987.
41. Drewinko B, Li YY, Barlogie B, Trujillo JM: Cultured human tumour cells may be arrested in all stages of the cell cycle during stationary phase: demonstration of quiescent cells in G1, S and G2 phase. *Cell Tissue Kinet*, 17: 453, 1984.
42. McCormick D, Chong H, Hobbs C, Datta C, Hall PA: Detection of the Ki-67 antigen and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB-1. *Histopathology*, 22: 355, 1993.
43. Key G, Becker MHG, Baron B et al: New Ki-67 equivalent murine monoclonal antibodies (MIB-1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest*, 6: 629, 1993.
44. Lopez F, Belloc F, Lacombe P et al: The labelling of proliferating cells by Ki-67 and MIB-1 antibodies depends on the binding of a nuclear protein to the DNA. *Exp Cell Res*, 210: 145, 1994.
45. Mazerolles C, Rishmann P, Chopin D et al: Usefulness of MIB-1 monoclonal antibody in assessing the proliferative index in human bladder carcinoma: comparison with Ki-67 antibody. *Histopathology*, 29: 963, 1994.

46. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM: Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immun*, 121: 2228, 1978.
47. Sebo TJ, Roche PC, Witzig TE, Kurtin PJ: Proliferative activity in Non-Hodgkin's Lymphomas. A comparison of the Bromodeoxyuridine labeling index with PCNA immunostaining and quantitative image analysis. *Am J Clin Pathol*, 99: 668, 1993.
48. Van Dierendonck JH, Wijsman SH, Keiuzer R et al: Cell-cycle-related staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. Comparison with BrdU labeling and Ki-67 staining. *Am J Pathol*, 138: 1165, 1991.
49. Wijsman JH, Van Dierendonck JH, Keuzer R et al: Immunoreactivity of proliferating cell nuclear antigen compared with BrdU incorporation in normal and neoplastic rat tissue. *J Pathol*, 168: 75, 1992.
50. Waseem NH, Lane DP: Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) structural conversation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci*, 96: 121, 1990.
51. Jaskulski D, Gatti C, Travali S, Calabretta B, Baserga R: Regulation of the proliferating cell nuclear antigen/cyclin and thymidine kinase mRNA levels by growth factors. *J Biol Chem*, 263: 10175, 1988.
52. Scott RJ, Hall PA, Haldane JS et al: A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferating with experimentally determined growth fraction. *J Pathol* 165: 173, 1991.
53. Howell M, Denton TE, Diamond JR: Differential staining of satellite regions of human acrocentric chromosomes. *Experientia* 31: 260, 1975.

54. Goodpasture C, Bloam SE: Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosome*, 53: 37, 1975.
55. Ploton D, Menager M, Jeannesson P et al: Improvement in staining and in the visualization of argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at optical level. *Histochemical J*, 18: 5, 1986.
56. Fakan S, Hernandez VD: The nucleolus and nucleolar organizer region. *Biol Cell*, 56: 189, 1986.
57. Derenzini M, Nardi F, Farabegoli F et al: Distribution of silver-stained interphase nucleolar organizer regions as a parameter to distinguish neoplastic from nonneoplastic reactive cells in human effusions. *Acta Cytol*, 33: 491, 1989.
58. Crocker J, Boldy DAR, Egan MS: How should we count AgNORs? Proposal for a standardised approach. *J Pathol*, 158: 185, 1989.
59. Nelson GO, Rosai J: Urinary tract, bladder and male urethra. *Ackerman's Surgical Pathology*, 8th edn, Mosby, St Louis, pp 1185, 1996.
60. National Bladder Cancer Collaborative Group A (NBCCGA): Surveillance, initial assessment and subsequent progress of patients with superficial bladder cancer in a prospective longitudinal study. *Cancer Res*, 37: 2907, 1977.
61. Loenig S, Narayama A, Yoder L et al: Factors influencing the recurrence rate of bladder cancer. *J Urol*, 123: 29, 1980.
62. Heney NM, Ahmed J, Flanagan MJ et al: Superficial bladder cancer: Progression and recurrence. *J Urol*, 130, 1083, 1983.

63. Quinn CM, Wright NA: The clinical assessment of proliferation and growth in human tumors: evaluations of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol*, 160: 93, 1990.
64. Blomjous CEM, Vos W, Schipper NW et al: The prognostic significance of selective nuclear morphometry in urinary bladder carcinoma. *Hum Pathol*, 21: 409, 1990.
65. Borland RN, Partin AW, Epstein JI, Brendler CB: The use of nuclear morphometry in predicting recurrence of transitional cell carcinomas. *J Urol*, 149: 272, 1993.
66. Hansen AB, Bjerregaard B, Ovesen H, Horn T: AgNOR counts and histological grade in stage pTa bladder tumours. Reproducibility and relation to recurrence pattern. *Histopathology*, 21: 591, 1992.
67. Smetana K, Gyorkey F, Chan PK, Tan EM, Bush H: PCNA and human malignant nucleolar antigens (HMTNA) in nucleoli of human haematological malignancies. *Blut* 46: 133, 1983.
68. Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR, Garrels JI: Identify of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature*, 303: 374, 1984.
69. Underwood JCE, Giri DD: Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants of malignancy. *J Pathol*, 155: 95, 1988.
70. Woods AL, Hanby AM, Hall PA et al: The prognostic value of PCNA immunostaining in gastrointestinal lymphomas (abstract). *J Pathol*, 161: 342a, 1990.

71. Jain S, Filipe NJ, Hall PA et al: Application of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in gastric cancer (abstract). *J Pathol*, 161: 351a, 1990.
72. Gerdes J, Dallenbach F, Lennert K: Growth fraction in malignant non-Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67. *Hematol Oncol*, 2: 365, 1984.
73. Zuber P, Hamou M-F, de Trinbolet N: Identification of proliferating cells in human gliomas using the monoclonal antibody Ki-67. *Neurosurgery*, 22: 364, 1988.
74. Vollmer E, Roessner A, Gerdes J et al: Improved grading of bone tumors with the monoclonal antibody Ki-67. *J Cancer Res Clin Oncol*, 112: 281, 1986.
75. Bouzubar N, Walker KJ, Griffiths K et al: Ki-67 immunostaining in primary breast cancer: pathological clinical associations. *Br J Cancer*, 59: 943, 1989.
76. Skopelitou A, Korkolopoulou P, Papanicolaou A et al: Comparative assessment of proliferating cell nuclear antigen immunostaining and of nucleolar organizer region staining in transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *Eur Urol*, 22: 235, 1995.
77. Krüger S, Müller H: Correlation of morphometry, nucleolar organizer regions, proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen expression with grading and staging in urinary bladder carcinomas. *Br J Urol*, 75: 480, 1995.
78. Shiina H, Igawa M, Nagami H et al: Immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antigen, p53 protein and nm23 protein and nuclear

DNA content in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer*, 78(8), 1762, 1996.

79. Shiina H, Igama M, Yagi H et al: Relationship of genetic instability with immunoreactivities for p53 protein and proliferating cell nuclear antigen in transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol*, 30: 80, 1996.
80. Skopelitou A, Hadjiyannakis M, Dimopoulos D et al: p53 and c-jun expression in urinary bladder transitional cell carcinoma: correlation with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) histological grade and clinical stage. *Eur Urol*, 31: 464, 1997.
81. Asakura T, Takano Y, Ikim et al: Prognostic value of Ki-67 for recurrence and progression of superficial bladder cancer. *J Urol*, 158: 684, 1997.
82. Okamura K, Miyale K, Koshikawa T et al: Growth fractions of transitional cell carcinomas of the bladder defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Urol*, 144: 875, 1990.
83. Mansour P, Crocker J, Newman J: Lack of prognostic value of NOR enumeration in transitional cell carcinoma of the bladder. *Arch Pathol Lab Med*, 114: 1261, 1990.
84. Tannock I, Gospodarowicz M, Connolly J, Jewett M: MVAC chemotherapy for transitional cell carcinoma: The Princess Margaret Hospital experience. *J Urol*, 142: 289, 1989.