

T.C.
İstanbul Üniversitesi
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Üroloji Anabilim Dalı

48074

**MESANE TÜMÖRLERİNDE FLOW SİTOMETRİ İLE
DNA ANALİZİNİN DEĞERİ**

(Uzmanlık Tezi)

Dr.Can Öbek

İstanbul - 1995

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM BAKANLIĞI
TEZ YAKLAŞIK DEĞERLENDİRME VE
DOKÜMANTASYON BÜYÜKLERİ

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince çok değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum, başta Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr.Vural Solok olmak üzere, kliniğimizin tüm öğretim üyelerine ve uzmanlarına teşekkürü borç bilirim. Beşbuçuk yıl süresince birlikte çalışma fırsatı bulduğum ve çalışma hayatında pekçok şeyi paylaştığımız asistan arkadaşlarıma ayrıca teşekkür ederim. Türkiye’de ve kliniğimizde Ürolojinin kurulup gelişmesini sağlayarak, bugün çağdaş bir ürolog olabilmemize zemin hazırlayan çok değerli emekli öğretim üyelerini saygıyla, bugün artık aramızda olmayanları da rahmetle anıyorum.

Uzmanlık tezimle ilgili çalışmanın gerçekleşmesindeki değerli destek ve katkılarından dolayı tez hocam sayın Doç.Dr.Ali Rıza Kural’a, laboratuvarının olanaklarından yararlanmamızı sağlayan Sayın Doç.Dr.Nezih Hekim’e, histogramların analizini yapan Sayın Dr.Elif Peşdereli ve Sayın Dr.Özge Alper Gürgen’e, sitolojik değerlendirmeyi yapan Sayın Uz.Dr.Nesrin Uygun’a ve istatistiklerin yapılması konusundaki yardımlarından dolayı sayın Yard.Doç.Dr.Selçuk Köksal’a teşekkürlerimi sunarım.

Dr.Can Öbek
Nisan 1995, İstanbul.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
MATERYAL VE METOD	36
BULGULAR	39
TARTIŞMA	57
SONUÇ	81
KAYNAKLAR	83

G İ R İ Ş

Son otuz yıl içinde mesane kanserinin fiziksel ve kimyasal yapısına ait bilgimiz hızla artmıştır. Mesane tümörü nedeniyle sistektomi uygulanan hastalara ait materyalin histolojik haritasının çıkarılması ve multipl mesane biyopsi incelemeleri sonucu, ürotelyal neoplazinin tüm mukozayı yaygın olarak ilgilendiren bir fenomen olduğu; radyoloji veya sistoskopi ile görülür hale gelen tümörün ise bu prosesin en belirgin safhası olduğu gösterilmiştir. İmmunoperoksidaz yöntemleri yardımıyla karsinoembriyojenik antijen ve kan grubu yüzey antijenleri gibi onkofetal maddelerin ölçülebilmesi ürotelyal neoplazinin biokimyasına ışık tutmuştur. Elektron mikroskopi çalışmaları kanserli mesane dokusunun ultrastrüktürünü ortaya koymuştur. Karsinom hücrelerinin kromozomal analizi, tümörün biyolojik davranışını yönlendiren yapısal anomalileri anlayabileceğimiz bir kapıyı aralamıştır. Önceleri spektrofotometri ve son yıllarda flow sitometri (FCM) ile deoksiribonükleik asid (DNA) incelemesi sayesinde ürotelyal hücrelerin nüklear yapısını keşfetmek mümkün olmuştur. Her yeni teknolojik gelişme ile birlikte ürotelyal neoplazi hakkındaki bilgimiz artmaktadır ve bunun sonucunda doğal olarak hekimler bu yeni metodları bir an önce klinik kullanıma geçirmek istemektedirler. Ancak maalesef kromozom analizi, elektron mikroskopi ve immunoperoksidaz reaksiyonları ile geçmişteki deneyimler, araştırma bazında çok değerli görülen bu yöntemlerin, klinik kullanıma girmek için pahalı, çalışılması zor ve yeterince duyarlı olmadığını göstermiştir. Yeni bir metodun hekimin günlük kullanımına girebilmesi için basit ve

kolay tekrarlanabilir olmasının yanısıra, mevcut sitolojik ve histolojik yöntemlerle elde edilene ilave bilgi verici olması şarttır.

Mesane kanserinin değerlendirilmesinde kullanılan yardımcı yöntemlerin en yenisi ve pekçok açıdan en umut verici olanı flow sitometridir. Mesane kanserli hastaların mesane yıkantı sıvılarında flow sitometri ile ilgili ilk çalışma 1976 yılında yayınlanmıştır. Bu tarihten itibaren konuyla ilgili pekçok yayın yapılmıştır ve bazı yayınlar birbirleriyle gelişmektedir. Ancak yirmi yıllık deneyim, flow sitometrinin araştırma laboratuvarlarına sınırlı kalmaktan çıkıp, giderek klinik kullanımdaki yerini sağlamlaştırdığını göstermektedir.

Bu çalışma, tekniğin ülkemize gelmesinden sonra, mesane tümörlerinin değerlendirilmesinde flow sitometrinin yerini irdelemek ve bu konuda kendi tecrübemizi ortaya koymak için yapılmıştır.

GENEL BİLGİLER

MESANE TÜMÖRÜ

Mesane tümörü genitoüriner sistemin ikinci sıklıkta görülen kanserdir, tüm malign hastalıkların % 2'sini oluşturur(51,90).

İstatistiklere göre Amerika Birleşik Devletleri'nde (A.B.D) her yıl yaklaşık 50.000 yeni mesane kanseri tanısı konan hasta vardır. Mesane kanserlerinin çoğu değişici epitel hücreli karsinomlardır .Mesane kanserlerinin biolojik davranışı çok geniş bir yelpaze oluşturur; bu yelpazenin bir ucunda selim davranışlı yüzeyel, düşük gradeli papillom, diğer ucunda ise çok habis davranan anaplastik karsinom yer alır. Tanı konduğunda tümörlerin yaklaşık % 75'i mesaneye lokalizedir(2). Bu tümörlerin yaklaşık % 75'inde rekürrens görülürken, progresyon oranı % 10-20'dir(27). Mesane kanserinin değişik formlarının prognozuna dayanan çeşitli evreleme sistemleri tarif edilmiştir(140,148). Bu sistemlere göre progresif hastalık belirli etaplardan geğerek ilerlemektedir, öte yandan klinik tecrübe sonucu edinilen izlenimize göre pek çok hastanın hayatı mesane kanseri nedeniyle risk altında değilken, bir diğer grup hastada daha ilk tanı konduğunda hastalık sonuçta hastayı lme götürecek bir formdadır(86).

Mesane kanserinin biolojik davranışı hakkındaki bilgilerimiz hala sınırlıdır, bu nedenle hastalığın belirli bir formundaki uygun tedavi

seçeneği ürologlar arasında farklılık göstermektedir. Kansere hücrelerinin buldukları bölgeye sınırlı mı kalacakları, yoksa yayılarak metastaz mı yapacaklarının cevabını hala aramaktayız. Ayrıca olası bir yayılımın zamanlaması hakkında da fazla fikir sahibi değiliz. Tüm bu soruların doğru yanıtlarını bildiğimiz zaman doğru tedaviyi uygulama şansına sahip olacağız.

TEMEL BİYOLOJİ

Mesane kanserinin etyolojisinde kimyasal karsinojenlerin rol oynadıklarına dair pek çok kanıt olmasına rağmen olguların çoğunda belirgin bir kimyasal madde teması saptanamamaktadır. Tüm kanserler genetik hastalıklardır; hücre diferansiyasyonu ve proliferasyonunu kontrol eden normal mekanizma ya yetersizdir ya da yanlış işlemektedir. Günümüzde bu bozukluklar hastanın genetik yapısındaki kalıtsal veya edinsel lezyonlara, veya viruslar veya kimyasal karsinojenler tarafından aktif hale geçen onkogenlere bağlanmaktadır. Gerçekte mesane kanserinin etyolojisine dair bildiğimiz çok sınırlıdır.

Mesane kanserlerinde renal pelvisten uretraya kadar tüm ürotelyumda anomali olabilir, bunun neticesinde hastalık fokal veya multifokal olabilir, zamanla farklı bölgelerde nüks edebilir. Bu nedenle hastalık için "polikronotopikal malign diatez" terimi kullanılmıştır(9). Bu terim farklı zaman (chronos) veya yerleşimde (topos), multipl tümör varlığını ifade etmektedir.

Değişici epitel hücreli karsinom hücrelerinin kolay implante olabilmeleri hastalığın bir diğer özelliğidir; bu nedenle multifokal karsinogenez, yetersiz rezeksiyon sonrası rekürrens ve tümör hücresi implantasyonu arasında ayırıcı tanı yapmak genellikle zordur. Makroskopik olarak normal görünen ürotelyumda da kromozomal anomalilerin mevcudiyeti gerçek multifokal bir etyoloji lehinedir.

EPİDEMİYOLOJİ

Mesane kanseri genitorüriner sistemin ikinci sıklıkta görülen kanseridir. 1992 yılında ABD'de 50.000 yeni olguya tanı konmuştur. Hastalık, erkeklerde 2.7 kere daha sıktır. Erkeklerde kanserler içinde görülme sıklığı açısından dördüncü sırada yer alır ve tüm kanserlerin % 10'unu teşkil eder. Hastalığın non-invaziv şekli beyaz ırkta zencilerden daha sıktır. Mortalite açısından ele alındığında, tüm kanserler arasında erkeklerde dördüncü sırada yer alır. 1950'li yıllardan beri hastalığın insidansı artmakta ve mortalitesi azalmaktadır (1987 Annual Cancer Statistics Review). Bunun muhtemel sebebi ortalama yaşam süresinin artması, gelişen erken tanı ve tedavi olanaklarıdır.

Mesane tümörü her yaşta görülebilir, genellikle ileri yaş hastalığıdır, ortalama görülme yaşı 67-70'dir. 30 yaşın altındaki hastalarda genellikle daha iyi difarensiyasyon ve selim seyirlidir(15).

ETYOLOJİ

Mesane kanserine yol açabileceği düşünülen çeşitli faktörler vardır: Çeşitli kimyasal maddelerle ilişkisi olan meslek grupları, sigara, kahve, analjezikler, yapay tatlandırıcılar, bakteriyel ve parazitik infeksiyonlar, mesane taşı, pelvik radyasyon ve sitotoksik kemoterapötik ajanlar.

Mesane tümörlerinde karsinojenlerin rolünü gösteren pek çok veri mevcuttur. Karsinojenler değişici epitel hücrelerinin genomunda lezyon oluşturarak karsinogenez olayını başlatır. Buna "initiation" denir. 1, 5, 7, 9, 11, 17, 18 ve 21. kromozomlara ait anomaliler bildirilmiştir. 9. kromozomdaki kaybın mesane kanseri için spesifik olabileceği düşünülmektedir. "Initiation" DNA'da irreversible bozulmaların ortaya çıkmasına yol açar. Eğer hücrenin DNA onarım gücü yetersiz ise veya hücre replikasyonu hızlanmış ise karsinogenez olayı hızlanır(166). Initiation fazından geçmiş hücrelerin proliferasyonunu hızlandırıp fenotipik olarak mesane kanserinin ortaya çıkması olayına "promotion" denir(30). Bu mekanizma çeşitli karsi-

nojenlerin mesane tümörü oluşumuna yol açmasını açıklamakta kullanılmaktadır. Promotion karsinojen maddeye uzun süreli ve devamlı maruz kalınmasıyla olmaktadır ve tümör gelişene dek reversible olduğu düşünülmektedir. Karsinogenezden sorumlu tutulan bir diğer mekanizma onkogenlerin faaliyete geçmesidir. Onkogenler habis fenotipi kodlayan, değişime uğramış genlerdir. Mesane kanserinde 1,11 ve 12. kromozomlara yerleşimli, ras gen ailesine dahil onkogenler saptanmıştır(125,177). Masters ve ark. c-myc onkogeninin evre ve grade ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir(105).

Karsinogenezde bir diğer olası mekanizma kanser supresör genlerinin kaybı veya inaktivasyonudur. Bu genler hücre büyümesini ve diferansiyasyonunu düzenler, kanser için spesifik olan kontrolsüz proliferasyonu önlerler. İyi bilinen bir supresör gen, p53, kromozom 17p yerleşimlidir ve mesane kanseri ile ilişkisi kanıtlanmıştır(138).

Üçüncü bir karsinogenik mekanizma growth faktör ve growth faktör reseptörlerinin regülasyonunu sağlayan genlerle ilişkilidir. Bu genlerin aktivitesinin normalden fazla olması, kronik hücre proliferasyonu ve kanser oluşumuna yol açabilir(110,117).

MESLEKİ RİSK (KİMYASAL KARSİNOJENLER)

1800'lü yılların ortasında kullanıma sunulan anilin boyalarının karsinojen olduğu bilinmektedir (Rehn, 1895). Anilin kullanılan işyerinde çalışanlar normal popülasyona göre 20 kat daha fazla risk altındadırlar. Mesane kanseri için karsinojen olduğu düşünülen aromatik aminler ve bunlarla ilişkili pek çok madde bildirilmiştir. ABD'deki mesane kanseri olgularının 1/4-1/3'ünün mesleki olduğu düşünülmektedir(31). Latent süre 40-50 yıl kadar uzun olabilir. Bu meslek gruplarından bazıları şunlardır: Oto işçileri, boyacılar kamyon sürücüleri, deri sanayiinde çalışanlar, kuru temizleme işçileri, diş teknisyenleri.

SİGARA

Sigara içenlerde mesane kanseri insidansı içmeyenlerin dört katıdır(29). Mesane kanseri olgularının % 25-% 60'ında sebebin sigara olduğu tahmin edilmektedir(113). Dolayısıyla sigara mesane kanseri etyolojisinde en önemli tek faktör gibi görünmektedir. Sigara dumanındaki spesifik kar-sinogen madde tanımlanamamıştır. Nitrosaminlerin ve 2-naphtylamine varlığı bilinmektedir; ayrıca sigara içenlerin idrarında triptofan metabolitlerinin arttığı gösterilmiştir(72).

KAHVE VE ÇAY İÇİMİ

Bazı çalışmalarda etyolojiden sorumlu olduğu yayınlanmıştır.

ANALJEZİKLER

Kimyasal yapısı anilin boyalarına benzer bir analjezik olan fena-setinin çok büyük miktarda (10 yılda 5-15 kg) alınması değişici epitel hücreli karsinom riskini arttırır(178).

YAPAY TATLANDIRICILAR

Çok yüksek dozda yapay tatlandırıcıya in utero veya neonatal dönemde maruz kalan kemirgenlerde mesane tümörü oluşumu görülmüştür(144). Ancak benzeri bir etki insanda gösterilememiştir.

KRONİK SİSTİT

Kalıcı kateter veya taşla birlikte olan kronik sistitte mesanenin skuamöz hücreli karsinomu görülme riski artar(96,101).

Schistosoma Haematobium sistiti ile skuamoz hücreli kanser arasında ilişki vardır.

Sistitte karsinogenezin mekanizması anlaşılammıştır; mesanede nitrit ve N-nitroso maddelerinin oluşumu ile açıklanmaya çalışılmıştır(157).

PELVİK RADYASYON

Serviks uteri kanseri nedeniyle radyoterapi uygulanan kadınlarda mesane tümörü riski normalin iki-dört katıdır(49,136).

SİKLOFOSFAMİD

Siklofosfamid tedavisi gören kişilerde mesane kanseri insidansı dokuz kat artar, ancak bu henüz kontrollü epidemiyolojik çalışmalarda ispatlanamamıştır(13). Siklofosfamidin primer metaboliti olan acrolein'in sorumlu olduğu düşünülmektedir.

ENDOJEN TRIPTOFAN METABOLİTLERİ

Kynurenine, kynureik asit, 3 hydroxkynurenine gibi karsinojen olduğu bilinen metabolitlere mesane kanserli hastaların idrarında daha yüksek oranda rastlanmıştır ancak çalışmalar bunun kanserin etyolojisinde rol oynamadığını göstermiştir(127).

PATOLOJİ

1- HİSTOLOJİK TİP ve PATERN

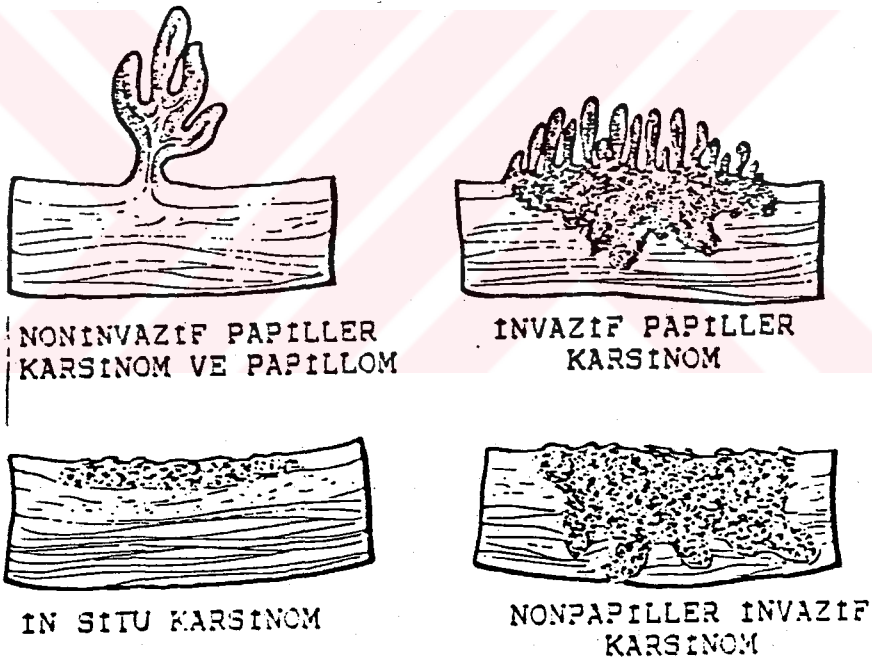
Normal mesane epitelini üç-yedi kat halinde sıralanmış değişici epitel hücrelerinden oluşmuştur. Bu epitelin altında bir-iki kat ara hücreler, onun altında ise basal hücre tabakası yani lamina propria vardır. En üstte ise geniş, düz şemsiye hücreleri yer alır.

Mesane tümörlerinin yaklaşık % 95'i epitelyal, % 5'i mezenkimaldir. Epitelyal olan tümörlerin % 90'ı değişici epitel hücreli geri kalan % 10'un yarısı epidermoid karsinom, diğer yarısı da adenokarsinom, sarkomatoid karsinom, indiferansiye karsinom ve nöroendokrin karsinomdur(130). Değişici epitel hücreli tümörlerde 5 yıllık sağkalım diğer gruba

göre daha iyidir, bu grupta 5 yıllık sağkalım % 13-37 olarak bildirilmiştir(130).

Histolojik patern değişici epitel hücreli tümörün papiller yapısı ve invazyonunu belirtir. Bu açıdan bakıldığında dört morfolojik patern ayırdedilebilir (Şekil 1).

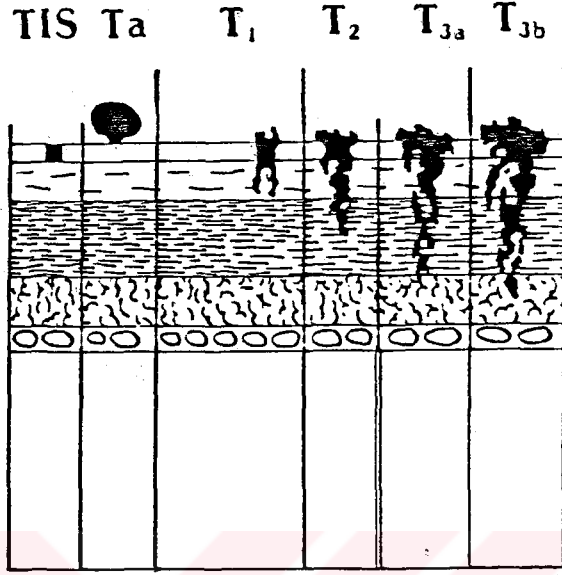
- 1- Noninvaziv papiller karsinom (veya papillom)
- 2- İnvaziv papiller karsinom
- 3- Noninvaziv, nonpapiller karsinom (in situ karsinom)
- 4- İnvaziv nonpapiller (solid) karsinom



Şekil 1

2- PATOLOJİK EVRE

Mesane tümörlerinde prognozu belirleyen en önemli faktör evredir(59,100,130).



Şekil 2. Mesane tümöründe patolojik evre

3- HİSTOLOJİK GRADE

Değişici epitel hücreli karsinomları grade'lemek için çeşitli sistemler önerilmiştir (Tablo 1). Biz çalışmamızda Ash'ın sistemini kullandık.

Sistemlerin tümü üst üste dizilen hücre miktarı, pleomorfizm, atipi, mitoz oranı gibi sitolojik özelliklere dayanmaktadır.

Tablo 1 : Grade'leme sistemleri

HİSTOLOJİK GRADE

ASH, 1940

TCC, GRADE 1

TCC, GRADE 2

TCC, GRADE 3

TCC, GRADE 4

MOSTOFI, 1960

PAPILLOMA

TCC, GRADE 1

TCC, GRADE 2

TCC, GRADE 3

BERGVIST, 1965

TC TUMOR, 0

TC TUMOR, 1

TC TUMOR, 2

TC TUMOR, 3

TC TUMOR, 4

4. YAYILMA YOLLARI

Mesane tümörleri lokal invazyon yapar; lamina propriayı aşarak submukoza ve muskularis tabakasına ilerleyen tümör hücreleri burada kan damarları ve lenfatik damarlara da girerek sistemik metastaz yapabilirler. Adale invazyonu ile uzak metastaz arasında anlamlı ilişki saptanmıştır(80). Lenf metastazları primer lenfatik drenaja uygun olarak iliak, hipogastrik ve presakral lenf nodlarıdır. Metastazların en sık görüldüğü yerler pelvik lenf nodları, akciğer, kemikler ve karaciğerdir. Ayrıca mesane kanseri lokal olarak yayılıp prostat, uterus, vajen, üreterler, rektum, barsaklar gibi komşu organlarda invazyon yapabilir.

YÜZEYEL MESANE TÜMÖRLERİNİN DOĞAL SEYRİ

Yüzeyel mesane tümörü tanımı Ta grade 1 gibi zararsız bir formdan T₁ grade 3 gibi hayatı tehdit eden bir forma kadar geniş bir spektrumu kapsar. Grade 2 tümörler ve karsinoma in situ (TIS) olguları da bu kapsamda ele alınır. "Yüzeyel" teriminin bırakılıp Ta, T₁, TIS terimlerinin kullanılması gerektiği bildirilmiştir (The Second International Bladder Cancer Consensus Meeting in Hakone, Japan)

Küçük (<0,5 cm) tek bir değişici epitel hücreli karsinom (DEHC) genellikle papillom gibi davranır, ancak yine de ilk tanı konulduğunda nasıl seyredeceğini tam olarak kestirebilmek imkansızdır. Mesanede bir daha hiç tümör oluşmayabileceği gibi seyrek veya sık rekürrensler görülebilir.

Ta grade 1 tümörlerin çok nadir progresyon gösterdiklerine dair verilerimiz giderek artmaktadır; halbuki adale invazyonunun bir düşük evreden başlayarak etap etap geliştiği düşünülmekteydi. Bugün için adale invazyonu gösteren tümörlerin çoğunun daha ilk tanı konduğunda invaziv olduğu bilinmektedir(37,86). Adale invazyonu gösteren tümörlerin ancak % 40'ı daha düşük evrelerden gelişir ve bunun da çok azı Ta Grade 1'den gelişen tümörlerdir.

Düşük evre ve düşük grade'li tümörlere TIS veya ağır displazinin eşlik etmesi invazyon riskini arttırır. Althausen ve arkadaşlarının bir çalışmasında bu tip tümörü olan 13 hastanın 11'inde invazyon saptanmıştır(1).

Grade 1 tümörler genellikle papillerdir ve mukoza ile sınırlıdır, ancak bir yayında 116 grade 1 tümörün 7'sinde ilk tanı anında lamina propria invazyonu bildirilmiştir(69). Grade 2 tümörlerin davranışını önceden kestirmek zordur. Grade 2 tümörü olan 94 hastanın 34'ünde lamina propria invazyonu saptanmıştır(69). Bergvist ve ark.(17) grade 2 tümörleri 2A ve 2B olarak iki gruba ayıran bir sınıflama tanımlamışlardır. Hücre paternine göre yapılan bu sınıflamada grade 2A'da 5 yıllık sağkalım % 84, 2B'de % 64'dür.

Grade 3 DEHC tanımlamasında pek görüş ayrılığı yoktur. Bu yüksek grade'li kanserdir; belirgin nükleer pleomorfizm, yüksek mitoz oranı ve aşikar hücre sel atipi içermektedir. Evre Ta'da nadiren görülür. Çoğu hastada en azından lamina propria tutulumu vardır. 3 yıllık takipte grade 3 tümörlerde % 48 oranında adale invazyonu gelişir(69). İşte bu noktada bir klinik çıkmaz gündeme gelmektedir: hangi hastalarda adale invazyonu olacak, hangilerinde olmayacak? Henüz muskularis propriayı tutmamış grade 2 ve 3 tümörlerde sistektomi uygulandığında % 50 olguda mesanenin gereksiz yere çıkartılmış olacağı açıktır. Bu konuda bize yardımcı olabilecek prognostik faktörler daha ileride ele alınmıştır.

KARCINOMA IN SITU (CIS, TIS)

Mesanedeki TIS tehlikeli bir antitedir. TIS, belirgin anaplazi ve çok sayıda mitoz gösteren hücreleriyle yüksek sitolojik grade'li, nonpapiller, intraüretelial, mukoza ile sınırlı lezyon olarak tanımlanabilir. Önceden nasıl davranacağı bilinmeyen, invazyon ve metastaz potansiyeli olan bir lezyondur. Herhangi bir evrede tümöre eşlik edebileceği gibi tek başına da bulunabilir(126). Lokalize veya diffuzdur. Radyoterapiye duyarlı değildir. Çalışmalar TIS olan pekçok olgunun transüretal rezeksiyon, koterizasyon veya intravezikal ajanlarla tedavi edilebileceğini göstermektedir.

1970'lerin sonunda Bacillus Calmette-Guerin (BCG)'nin kullanıma girmesine kadar TIS'a karşı etkili bir silahımız yoktu. Bu yöntem TIS'nun kaderini değiştirmiştir, bugün olguların % 65-70'i düzenli mesane instilasyonları ile hastaliksız yaşatılabilmektedir(97). BCG'ye yanıt vermeyen olgularda fotodinamik tedaviye % 70-80 oranında yanıt alınmaktadır; bunun uzun süreli etkinliği bilinmemektedir(16).

TIS'nun doğal seyrini dökümanete edebilmek özellikle zordur. BCG öncesi uygulanan farklı tedavi yöntemleri vardı, bazı hastalara derhal sistektomi uygulanırken, bazılarında koterizasyon, bazılarında ise intravezikal thiotepa veya doxorubicin uygulanmaktaydı. Bu tedavilerden çelişkili sonuçlar bildirilmiştir. Sistektomi materyallerinin incelenmesinde % 60 olguda distal üreter veya prostatik üretra tutulumu saptanmıştır(126). İlk tanı konduğunda TIS saptanan olguların prognozu sonradan TIS gelişenlere göre daha kötüdür(126). İntravezikal tedaviye rağmen TIS'nun devam ettiği olgularda sistektomi + üreterektomi uygulanmalıdır.

REKÜRRENS

Mesane tümörlerinin tekrarlama eğilimi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir(14,60,69,103). Bu çalışmalardan birinde(60) hastalar yalnızca transuretral rezeksiyon ve koterizasyon ile izlenmiştir, yani hiçbirine intravezikal tedavi, parsiyel sistektomi, radyoterapi vb. tedavi uygulanmamıştır. Böyle bir grup günümüz modern tıbbında hastalığın "doğal seyrine" en yakın kabul edebileceğimiz bir gruptur. 1 yıl boyunca izlenen 249 hastada rekürrens açısından grade 1 ve 2 tümörler arasında fark saptanamamıştır (% 30-% 38). Grade 3 tümörlerde ise rekürrens oranı % 70'dir. 3 yılda rekürrens oranları grade 1 için % 50, grade 2 için % 59, grade 3 için % 80'dir. İlk tanı konduğunda evre Ta olan hastalarda 3 yıllık rekürrens oranı % 48 iken, T₁ olanlarda % 70'dir.

PROGRESYON

National Bladder Cancer Group Ta ve T₁ tümörleri ortalama 39 ay takip etmiştir(69). 207 hasta çalışma programına alınmış, grade 1, 2 ve 3 için adele invazyonu veya metastaz olarak tanımlanan progresyon oranı sırasıyla % 2, % 11 ve % 45 bulunmuştur.

Ta hastalarda progresyon oranı % 4 iken, T₁'de % 30'dur.

Ta grade 1 olgularda progresyon % 2, T₁ grade 3 olgularda ise % 48,

Ta grade 2 olgularda % 6, T₁ grade 2 olgularda % 21'dir.

Prout'un 178 Ta grade 1 olgusunu kapsayan çalışmada, 28 olguda takipte daha yüksek gradeli tümör gelişmiştir(126). Yirmiüç hastada (% 13) grade 2, 5 hastada (% 3) grade 3 tümör gelişmiştir. Evre açısından progresyon yalnızca sekiz hastada saptanmış; 5 hastada (% 3) lamina propria, 3 hastada (% 2) adele invazyonu ortaya çıkmıştır.

Malmström daha yüksek T evresine yayılım oranlarını Ta için % 15, T₁ için % 29 olarak bildirmiştir(104).

Anderstrom va ark.(3) 99 evre T₁ olgusunda 5 yıllık sağkalım oranını grade 2 ve 3 için % 83 ve % 63 saptamışlardır. Lamina propriadaki kan damarlarında invazyon görülmesi kötü bir prognostik faktör olarak bulunmuş, böyle 10 olgunun 7'si mesane kanseri nedeniyle ölmüştür.

Mesane kanserinin doğal seyri ve biyolojik davranışını kestirebilmek için kullanılmış klasik veriler sistoskopik veya patolojik bulgulara dayandırılmıştır. Yukarıdaki verilere bakıldığı zaman tümörün davranışını önceden saptayabilmek için çok önemli ilerlemeler kaydetmemiz gerektiği izlenimi ortaya çıkmaktadır. Ancak bu şekilde hastalara sunduğumuz tedavinin kalitesini yükseltmek ve hastalarımızın sağkalım sürelerini uzatmak mümkün olacaktır.

YÜZEYEL MESANE TÜMÖRLERİNDE PROGNOSTİK FAKTÖRLER

Mesane tümörünün biyolojik davranışını önceden tahmin edebilmek için pekçok faktör gözönüne alınmalıdır. Rekürrens ve progresyon açısından risklerin bilinmesi pratikte sınırlıdır. Çünkü halen bilemediğimiz faktörler ve klinik değerlendirmede yanılma paylarımız mevcuttur. Her hastanın kendi hastalığı ile ilgili farklı bulguları dolayısıyla kendi hastalığının özel doğal seyri vardır. Hastanın yaşı, genel durumu ve önerilecek tedaviye adapte olabilirliği de üroloğun değerlendirmesi gereken faktörlerdir.

Bu bölümde yüzeysel mesane tümörlerinin biyolojik davranışını önceden kestirebilmek için kullanılan faktörler gözden geçirilecektir.

Tablo 2 : Yüzeysel mesane tümöründe prognostik faktörler

- Tümörün boyutu	İntarvezikal tedaviye yanıtsızlık
- Tümörün konfigürasyonu	- Prostatik uretrada tümör
- Grade	- Rekürren tümör
- Submukoza invazyonu	- Tümör markerleri
- TIS	- DNA Yapısı
- Multifokal tümör	
- Post-op (+) sitoloji	

TÜMÖR BOYUTU

Tümör boyutu ile rekürrens ve progresyon arasında anlamlı ilişki vardır, çoğu çalışmada daha küçük tümörlerde rekürrens ve progresyon oranlarının daha düşük olduğu gösterilmiştir.

TÜMÖR KONFIGÜRASYONU

Mesane tümörleri konfigürasyonlarına göre iki tip gelişim gösterirler: papiller ve solid (sesil veya nodüler). Papiller tümörler genellikle saf değişici epitel hücrelerinden oluşmuştur; öte yandan sesil veya nodüler

tümörler skuamöz ve glandüler yapılar içerir ve daha sık adale ve lenfatik invazyon gösterirler. Hem tümör rekürrensini, hem progresyon oranının papiller tümörlerde daha düşük olduğu; sağkalım süresinin de yine papiller tümörlerde daha uzun olduğu bildirilmiştir.

Bir çalışmada sağkalım oranı papiller ve solid tümörler için % 94 ve % 71'dir(37). Jordan ve arkadaşları tümör konfigürasyonunun histolojik grade ile de ilişkili olduğunu göstermişlerdir(82). Solid tümörlerin hiçbiri grade 1 değilken % 10'u grade 2, % 70'i grade 3'dür(82). Ayrıca grade 3 solid tümörlerin grade 3 papiller tümörlere oranla daha hızlı progresyon gösterdiği saptanmıştır ($p < 0.02$).

TÜMÖR GRADE'İ

1922'de Broders tümörlerin malignite derecelerine göre sınıflanabileceğini ve böylece tümörün biyolojik potansiyelinin belirlenebileceğini göstermiştir(22). Torti ve ark.'a göre adale invazyonu ile progresyonda tek istatistiksel anlamı olan prognostik faktör tümör grade'idir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) gradelerine göre progresyon oranları grade 1, 2 ve 3 için sırasıyla % 2, % 11 ve % 45'dir.

Tümör gradelemesinde subjektivite unutulmamalıdır; farklı sınıflama sistemleri vardır, ayrıca aynı preparatın değerlendirilmesinde kişilerarası ve aynı kişinin farklı zamanlarda yorum değişikliği yapıldığı bilinmektedir.

KARSİNOMA IN SITU

TIS'in agresif bir doğası olduğundan daha önce söz edilmişti. Ancak yeni çalışmalar TIS'nun da farklı biyolojik potansiyelleri olan değişik tiplerinin olduğunu ortaya çıkartmıştır. Yine de pekçok araştırmaya göre TIS hem rekürrens hem de progresyon açısından önemli bir risk faktörü olarak değerlendirilmeye devam etmektedir. Primer TIS neoplazmalarının yaklaşık yarısında 5 yıl içinde yüksek gradeli invazif karsinom gelişmekte-

dir(130). Mesanede TIS olan hastaların önemli bir kısmında, lezyonun prostat duktusları içinde de devam etmesi, bu lezyonun prognozunda gözönünde tutulması gereken bir faktördür(130). Fug ve ark. nüks oranını tümöre eşlik eden TIS olgularında % 40, TIS bulunmayan olgularda ise % 6 olarak bildirmektedir(59).

EVRE T₁

Lamina proprianın ürotelyumdan farkı kapiler ve lenf damarları içermesidir, bu nedenle Ta tümörlerde eğilim mukozaya lokalize kalmak iken, T₁ tümörlerde hematojen ve lenfatik yayılım riski yüksektir.

T₁ tümörlerde adale invazyonu grade 1, 2 ve 3 için sırasıyla % 0, % 21 ve % 48 olarak bildirilmiştir(69).

T₁ tümörlerde rekürrensin de kötü prognostik değeri vardır. Progresyon açısından değerlendirildiğinde primer ve rekürren Ta tümörlerde oran % 20 ve % 25, T₁ tümörlerde ise % 24 ve % 56'dır(103).

BCG tedavisine yanıt vermeyen T₁ tümörlerde prognoz kötüdür, bu tümörlerin % 43'ünde 1 yıl içinde adale invazyonu bildirilmiştir(70).

TÜMÖRÜN SAYISI VE BOYUTU

Mesane tümörlerinde neoplastik gelişim tüm ürotelyumu ilgilendirir.

Papiller tümörlerin sayısı rekürrens açısından önemli bir risk faktörüdür. Dalesio ve ark.(38) yeni tümör oluşumunda en önemli tek prognostik faktörün, tanı konduğunda saptanan tümör sayısı olduğu yayınlamıştır. Lerman ve ark.(99) rekürrens oranını tek tümörler için % 31 multipl tümörler için % 66 olarak bildirmiştir.

Bir diğer prognostik faktör tümör boyutudur. Heney ve ark.(69) 5 cm'den büyük tümörlerde progresyon oranını % 35, daha küçük tümörlerde ise % 9 olarak bildirmişlerdir.

ÜROTELYAL ATİPİ VE DİSPLAZİ

Mesane mukozasında tümörün dışında bir bölgede atipi veya displazi varlığı da ilave bir prognostik faktördür(1,141,173). Smith ve ark.(141) eşlik eden displazi veya TIS varlığının rekürrens oranını % 43'den % 73'e yükselttiğini saptamışlardır. Althausen ve ark.(1) çalışmalarında tümöre komşu mukozada atipi varlığın invazyon açısından riski % 3'den % 36'a çıkarttığını bildirmişlerdir.

INTRAVEZİKAL TEDAVİYE YANIT ALINMAMASI

Genellikle intravezikal tedavinin rekürrens ve progresyon açısından yüksek risk grubundaki hastalara uygulandığını düşünürsek, tedaviye yanıt alınamamasının kötü prognostik bir faktör olduğu açıktır. Soloway intravezikal kemoterapinin primer tedavi olarak uygulandığı vakalarda tam yanıtın % 62, bir kür tedaviye yanıt vermeyenlerde % 20 olduğunu ve ikinci grupta % 19 oranında adele invazyonu geliştiğini bildirmiştir(142).

THOMPSON - FRIEDENREICH (T) ANTİJENİ

Bu antijen insan eritrositlerinde bulunan bir kriptik disakkarid-dir. ABH kan grubu antijenlerinden bağımsızdır. T antijeni varlığının adele invazyonu ve kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir(32,79).

LEKTİN BAĞLAYICI KARBOHİDRAT YAPILARI

Tümör hücrelerinin yüzeyinde lektin bağlayıcı karbohidrat yapının azalması, kanser progresyonu ile ilişkili bulunmuştur(98).

ABH KAN GRUBU ANTİJENLERİ

Yüzeyel mesane tümörlü olgularda, kan grubu 0 olanlarda yüksek gradeli tümör ve progresyon insidansı yüksektir(123). Değişici epitel hücrelerinin malign transformasyona uğradıkça ABH kan grubu antijenlerini kaybettiği görülmüştür(32). Lewis antijeninde ise artış görülür. Bu değişikliğin sebebinin tümör hücresinin glikoziltransferaz enzim bozukluğu olduğu ileri sürülmektedir.

ONKOFETAL PROTEİN

Bazı mesane kanserlerinde karsinoembriyjenik antijen(76,170) veya koriyonik gonadotropin salgılanmaktadır(23). Yüksek gradeli DEHC'da % 20 oranında trofoblastik diferansiasyon olur ve kötü prognoz ile radyoterapiye duyarsızlığı gösterir.

EPİDERMAL GROWTH FAKTÖR RESEPTÖRLERİ

Epidermal growth factor (EGF) pekçok dokuda hücre bölünmesini hızlandıran bir polipeptiddir. EGF kanser hücrelerinin sınırsız çoğalmasında uyarıcı bir faktör olabilir. EGF reseptörü miktarı ile tümör grade ve evresi ve progresyona kadar geçen süre arasında ilişki gösterilmiştir.

DİĞER BİYOKİMYASAL MARKERLER

N-ACETYLTRANSFERASE AKTİVİTESİ: Düşük N-acetyltransferase aktivitesi aromatik aminlerin detoksifikasyonunda yetersizliğe yol açarak bu karsinojenin konsantrasyonunun artmasına neden olabilir. Epidemiyolojik çalışmalar yüksek N-acetyltransferase aktivitesinin mesane kanserine karşı koruyucu etkisini saptamıştır(184).

AUTOCRINE MOTILITY FACTOR (AMF): Bir cytokin olan bu faktör tümör hücrelerinin motilitesini artırır ve lokal invazyonda etkili olabileceği düşünülmektedir. AMF miktarı idrarda ölçülebilir(185).

PLASMINOGEN ACTIVATOR

Plazmin ekstraselüler matriksin bozulmasına ve bazal membranında kollajen yıkımına yol açan iki enzimin aktivasyonuna yol açar. Plasminogenin plasmine dönüşünü sağlayan plasminogen activator seviyesinin mesane kanserli kişilerde normale oranla yüksek olduğu saptanmıştır(186).

TISSUE POLYPEPTIDE ANTIGEN (TPA): Plazma TPA seviyesi mesane tümörünün tüm evrelerinde duyarlı bir marker olabilir. Yüzeysel tümörü olan olgularda TPA yüksekliği oranı % 15, invazif tümörlü olgularda ise % 74 olarak bildirilmiştir(68).

TRANSFERRİN RESEPTÖRÜ: Transferrin varlığı proliferatif aktivitenin bir göstergesi olabilir. Bu reseptörün primer tümörde varlığının, rekürrens oranı ile direkt ilişkili olduğu gösterilmiştir(188).

MESANE TÜMÖRLERİNİN TANI VE TAKİBİNDE SİTOLOJİ

İdrar sitolojisi ilk defa 1946 yılında kullanıma girmiştir; yöntem çok deneyimli bir patolog için dahi zaman zaman kolay değildir ve bu nedenle topladığı sempati kadar destekçi bulamamıştır(179). Her zaman çok başarılı olmayan sonuçlar alınmış olmasının bazı nedenleri vardır. Ürotelyal hücrelerin replikasyonu için yaklaşık bir seneye gerek vardır, bu nedenle her bir muayenede incelenebilecek hücre sayısı sınırlıdır. Dökülen hücreler asit ve düşük osmolaliteli, yani hücre için uygun olmayan idrar ortamında kalarak tanı koydurucu önemli özelliklerini kaybedebilirler. İdrar örneğinin toplanması, korunması, çalışılması ve yorumuna dair farklı görüşler mevcuttur ve bu konudaki literatür yetersizdir. Belki bunun etkisinde kalan klinisyenler tetkiki çok fazla istememiş, bu da patologların deneyiminin ve bu konuda kendilerine olan güvenlerinin daha da azalmasına sebep olmuştur(179).

Bununla beraber son yıllarda ürotelyal hücrelerin patolojik

değerlendirmesine yönelik ilgi giderek artmaktadır. Bunun ana nedeni, ürologların mesane tümörlü hastaların takibinde sistoskopi, hatta şüpheli saha veya random biopsilerin yetersiz olduğunu görerek takip yöntemlerini genişletmek istemeleridir. Topikal ajanlarla tedavi edilen ve uzun süreli takip edilen hastalarda rezidüel tümör varlığı veya nükslerin saptanmasında sitoloji vazgeçilmez bir yöntem olmuştur.

Sitolojik inceleme için mevcut teknikler arasında, taze işenmiş, random idrar sedimenti yaymasının Papanicolaou yöntemi ile boyanıp, ışık mikroskopu ile incelenmesi en yaygın, pratik ve kullanışlı olanıdır. Son yıllarda ürotelyumdaki bozukluğun tümör olan bölgeye lokalize olmayıp tüm sistemi ilgilendirdiğinin ve TIS'nun öneminin daha iyi anlaşılması, sitolojinin önemini ön plana çıkartmıştır. Sistoskopik muayenede bir lezyonun gösterilemediği durumlarda da sitolojinin pozitif olabileceği öğrenilmiştir. Bu gibi durumlarda prostat, prostatik üretra, üst üriner sistem ve mesane epitelinin endoskopik olarak normal görülen bölgelerinde neoplastik hücrelerin bulunduğu saptanmıştır. Farrow ve ark.'nın 106 olguluk bir çalışmasında daha önce mesane tümörü anamnezi olmayıp, sistoskopik muayenesi normal ancak sitolojisi pozitif olan hastaların üçte ikisinde (69 olgu) biopsilerle TIS varlığı ispatlanmıştır(52). Hücrelerin birbirlerine bağlantılarında zayıflamasının TIS için karakteristik olduğu ve biopsilerde mukoza saptanamazken idrar veya yıkantı sıvısında malign hücre varlığının buna bağlı olabileceği ileri sürülmüştür. Elektron mikroskopisinde bu hücreler arasındaki tight junctionların ve desmosomların kaybolduğu gösterilmiştir(167).

Papiller yapıdaki düşük gradeli tümörlerin saptanmasında sistoskopi sitolojiden daha üstündür. Bunun izahı grade 1 DEHC'un yapısı ile yapılmaktadır. Bu hücreler normal hücrelerden çok az farklılık gösterirler, tanı için fibrovasküler bir pedikül, epitelyal kalınlaşma ve mitozda artışın saptanması gerekmektedir. Bu hücrelerin ayırımı bir sitopatolog için çok güçtür, yayınlarda bu tümörlerin sitoloji ile tanınmaları % 22 ile % 62 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir.

Sitoloji yüksek gradeli lezyonları saptamada daha duyarlıdır. Yani sitoloji, sistoskopi ve biopsiyi tamamlayıcı, mükemmel bir yöntemdir. Şöyle ki; düşük gradeli papiller tümörler sistoskopi ile çok rahat görülebilir, öte yandan erken invazif karsinom, TIS ve displazi sistoskopide normal görülebilir veya inflamatuvar bir lezyondan ayırd edilemeyebilir. Ayrıca mesane yıkantı sıvısı analizi ile sistoskopide saptanamayan multisentrik hastalık gözden kaçırılmaz.

Mesane yıkanarak alınan sitolojik örnek inceleme için daha uygundur, ancak hiçbir hastaya yalnız yıkantı sıvısı almak için kateterizasyon veya endoskopi önerilmemektedir(179). Bu durumda en uygun örnek taze işenmiş, random idrardır. Uzun süre muhafaza edilmeyecek idrar örneğinin alkolde saklanması gereksizdir, bakteri üremesini ve hücrelerin dejenerasyonunu önlemek için çalışılana kadar buzdolabında muhafaza edilmesi uygundur. Sitolojik detayların en iyi ortaya konduğu boyama yöntemi, Papanicolau'nun bir formudur(179).

Mesane yıkantı sıvısında çalışılmış bir sitoloji örneğinin duyarlılığı (sensitivite) grade 1 olgularda % 10, grade 2'de % 50 ve grade 3 olgularda % 90'dır.

Yakından takip zorunluluğu olan mesane tümörlü hastalarda hem ürolog, hem de hasta açısından vazgeçilmez gibi görünen sistoskopinin bilinen dezavantajları nedeniyle en azından sıklığına azaltma çabaları hep gündemde tutulmuştur. Bu amaçla en sık araştırılan, üzerinde durulan ve en yaygın kullanılan yöntem sitoloji olagelmıştır.

Flow sitometrinin kullanıma girmesi, sitolojiye yepyeni bir boyut getirmiştir. Rekürren tümörü olan hastaların değerlendirilmesi ve takibinde, TIS tanısında en az konvansiyonel sitoloji kadar sensitif ve spesifik olmanın yanısıra kantitatif bir yöntem olmak özelliğine de sahiptir.

FLOW SİTOMETRİ

Flowsitometri, yüksek hızlı bilgisayarların yaşama geçirilmesi sayesinde geliştirilen kantitatif bir sitoloji yöntemidir. İlk kez 1960 yılında Herbert Derman adında bir patolog ve John Hoffer adında bir bilgisayar uzmanı tarafından sitoflorografi cihazı olarak tasarlanmıştır. Sitoflorografi cihazı Caspersson ve arkadaşlarının esaslarını belirlediği hücre çekirdeğinin floresan boyanma özellikleri gözönüne alınarak geliştirildi(106). Bu yöntemin amacı servikal kanser taramasında Papanicolaou yaymasının otomatik olarak analizini yapmaktı. Kamenstsky 1963 yılında sistemi modifiye ederek, hareketsiz hücrelerin analizi yerine hareketli ortamda hücre analizi yapabilmeyi sağladı (flowsitometri)(84,85). Daha sonra da flowsitometri cihazı hücre biyolojisi ve patolojisinin incelenmesi için değişik alanlarda kullanıma girdi.

Flowsitometrinin Prensipleri

Flowsitometri lam üzerindeki hücrelerin optik özelliklerini taramayan sitofotometri ve imaj-sitometrinin tersine, çok daha hızlı olarak ve birden fazla parametrenin analizini yapma olanağını vermektedir. Dolayısıyla yöntem fazla sayıda hücrenin incelenmesini de sağlar (yaklaşık 100 kat). Temel olarak flowsitometri floresansı ölçüp kaydetme esasına dayanır. Uygun bir florokromla boyanmış ve bir eksitasyon kaynağına doğru hareket eden hücrelerin floresans dereceleri ölçülür ve dijital olarak elektronik uyarıma dönüştürülür. Eksitasyon kaynağı genellikle 450 ila 514 nm dalga boyunda monokrom ışık veren xenon-civa ya da argon laserdir. Bu ışık hücresel elemanların floresan boyalarını maksimum absorpsiyonunu sağlar. Analiz genellikle saniyede 100-200 hücre hızıyla yapılır. Floresan ölçümler

kompiiterin hafızasında saklanır. Floresans yanında hücre büyüklüğü de ölçülebilir(107,137).

Flowsitometri için Materyalin Hazırlanması

Flowsitometrik analiz taze dokularda ya da saklanmış dokularda yapılabilmektedir(152).

a) Hücre süspansiyonu: İncelemede en önemli nokta incelenecek hücre popülasyonunun tek hücre süspansiyonu halinde olmasıdır. Periferik kan hücreleri, kemik iliği hücreleri ve lenfoid doku gibi hücreler arasında bağlantıların olmadığı durumlar idealdir. Ancak solid tümörlerden tek hücre süspansiyonu hazırlamak son derece zordur. Parenkimal organların hücrelerini ayırmak daha kolay iken, epidermal hücreleri kuvvetli desmozomları nedeniyle ayırmak daha zordur. Hücreleri ayırmak için EDTA, pepsin, tripsin ve kollagenaz vb. proteolitik maddeler önerilmiştir ancak standart olarak uygulanan bir madde yoktur. Ayırma işleminin kendisi de hücre sitoplazmasına zararlı olabilmektedir(18,60,150).

b) Hücre Çekirdeğini İzole Etme Teknikleri: Solid dokulardan hücre süspansiyonu hazırlamanın zorlukları dikkate alınarak, DNA gibi hücresel elemanların analizinin de mümkün olabildiği, çekirdeğin hücreden sağlam olarak izolasyonunu sağlayan yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler taze dokuda ve arşivlenmiş materyalde farklıdır(91,174).

i- Taze materyal: İlk tanımlanan çekirdek izolasyonu tekniği sitrik asid-sodyum sitrat tamponu (CASC) uygulamasıdır. Düşük pH'lı bu solüsyon desmozomları ve epitelyal hücrelerin sitoplazmalarını tahrip eder, ancak florlu boyaların çekirdeğe penetrasyonunu kolaylaştırır(91). Bu tekniğe benzeyen başka teknikler de tarif edilmiştir(95,164). Daha az hücre kaybına yol açan tekniğin uygulanması doğru olur. CASC genellikle yeterli sonucu veren bir yöntemdir.

ii- Arşivlenmiş materyal: Hedley 1983'ta parafine gömülü olarak saklanmış tümör dokularından flowsitometrik DNA analizini mümkün kılan bir teknik tarif etmiştir(65-66,67). Bu sayede yetersiz klinik takip nedeniyle ancak küçük bir hasta grubunda yapılabilen prospektif çalışmaların yerine, klinik seyirleri bilinen vakaları irdeleyerek retrospektif olarak daha çok sayıda vakayı inceleme imkanı veren çalışmaların yapılabilmesi olanağı ortaya çıkmıştır(34). Metod 30-50 μ m kalınlığında parafinize tümör dokusunun deparafinizasyonunu, proteolitik enzimlerle (tripsin, pepsin) dokudaki hücrelerin ayrılmasını, hücre çekirdeğinin alkolle rehidrasyonunu ve florlu boyalarla boyanmasını içerir. Bu yöntem farklı flowsitometri cihazlarının kullanıldığı çok sayıda laboratuvarın katıldığı çalışmalarda test edilmiş ve şaşırtıcı şekilde yakın sonuçlar elde edildiği ortaya çıkmıştır(33). Ölçümler dokunun boyutu, saklanma süreci ve fiksasyon yöntemine yakından bağlıdır. Formalin dışındaki maddeler DNA proteinlerini denatüre ettiği için sadece formalinle fikse edilmiş materyaller kullanılmalıdır.

c) Boyama: Klinik laboratuvarlarda flowsitometri en çok lenfohematopoetik hücrelerin, alt gruplamasının yapılması ve nükleik asitlerinin ölçümü için kullanılmaktadır. Ancak çalışmanın amacına göre hücrenin belli yapılarını seçici olarak boyayan boyaların kullanılması ile değişik uygulamalar yapılabilmektedir(107,137). Birden fazla parametre incelenecekse birden fazla boyama da yapılabilmektedir. Ancak bu durumda boyamaların karakteristiklerinin iyi bilinmesi gerekir, çapraz floresan özellikleri olan boyalarla yanlış sonuçlar alınmasına yol açabilir(30,75,150).

DNA, RNA ya da protein gibi tek parametre ölçümleri doğrudan hücrenin o komponentinin boyanması ile sağlanır(107,137). DNA analizi için propidium iodide, ethidium bromide ve diamidine phenylindole sık olarak kullanılmakta-

dır. Acridine orange hem DNA'yı hem de RNA'yı boyar ve aynı anda iki parametrenin de ölçümünü sağlar(39,40).

Herhangi bir dokuda ve herhangi bir parametre için standart bir boyama yöntemi olmamakla beraber, önerilen boyama tekniği o laboratuvarın sürekli kullandığı, yaptığı ve alışkın olduğu boyama yöntemini uygulamasıdır. A.B.D.de laboratuvarlar arasındaki ölçüm farklılıklarını ve hatta laboratuvarın kendi ölçümleri arasındaki farklılıkları değerlendirmek için National Cancer Institute mesane tümörü dokularını ve mesane yıkama sıvılarını test aracı olarak kullanmaktadır(33).

Verilerin Analizi

a) Verilerin Gösterilmesi:

Flowsitometriden üretilen veriler, ya anında bir video ekranından izlenir ya da daha sonra almak üzere kompüterin hafızasına kaydedilir. Tek parametre ölçümü yapılıyorsa boyanmış hücrelerin sayısı floresan enerji fonksiyonu olarak histogramda vertikal ekseninde gösterilir. Eğer iki- den fazla parametre ölçülüyorsa sonuçlar ölçümler arasındaki korrelasyonu gösterecek şekilde aynı histogramda pikler halinde gözlenir.

DNA içeriği ploidinifadesi olarak hesaplanır ve ekranda gösterilir. Teorik olarak bir hücre popülasyonundaki DNA miktarı, kromozom sayılarına bağlı olmalıdır (diploid örnekler için 46, tetraploid örnekler için 92).

Bir hücre popülasyonundaki DNA içeriğini gösteren diğer bir gösterge de DNA indeksidir(71). DNA indeksi histogramda elde edilen pikleri, tümörün kaynaklandığı normal dokudan elde edilen kontrol ölçümlerindeki diploid piklere göre ifade eden bir formüldür. Örneğin floresan yoğunluk skalasında kanal 70'de pik elde edilmişse ve normal diploid pikler kanal 40'da elde ediliyorsa burada DNA indeksi $70/40 = 1.75$ olacaktır.

Tablo 3 : DNA indeksine (DI) göre hücredeki DNA içeriğinin adlandırılması

<i>Terim</i>	<i>DI</i>
Diploid	= 1.0
Aneuploid	> 1.0, < 1.0
Hipodiploid	< 1.0
Hiperdiploid	> 1.0
Tetraploid	= 2.0
Hipertetraploid	> 2.0
Multiplid	birden fazla aneupolid

Ancak normal dokudan elde edilen piklerin pozisyonu histogramda beklenen pozisyondan % 10 kadar sapabilmektedir(36).

b) Kontroller:

Flowsitometrinin önemli konularından birisi de uygun kontrollerin kullanılmasıdır. Bilinen benign bir hücre popülasyonunun (örneğin inaktif lenfositler) diploid piklerinin kanal pozisyonunun kontrolünde kullanılabilir. Veya tavuk eritrositi gibi DNA içeriği bilinen ve sabit olan bir hücre popülasyonu, bilinmeyen hücre süspansiyonuna katılarak histogramın yorumunda referans olarak kullanılabilir.

Ancak incelenen dokuya ya da incelemenin yapıldığı kişiye yabancı kaynaklardan elde edilen ve kontrol amacıyla kullanılan hücre popülasyonları, değişkenlikler gösterebilmektedir. Bu nedenle kontrol ölçümlerinin aynı kişiye ait ve hatta aynı dokuya ait hücreler üzerinde ve aynı laboratuvar koşullarında yapılması daha doğru sonuçlar alınmasını sağlayacaktır(175).

c) Histogramın istatistik analizi:

Histogramların analizi ve ölçümlerin kalitesinin kontrolü için önerilen yöntemler varyasyon katsayısı (coefficient of variation-CV), eğim ve kurtosisdir(107,137).

Varyasyon katsayısı (VK-CV) ilk floresan pikteki ortalama kanal pozisyonunun yarı ya da tam genişliğini onun standart sapmasına bölerek elde edilir. VK bir yüzdendir ve eğrinin doğruluğunu değerlendirmede bir ölçek olarak kullanılır. Bilinen saf bir hücre populasyonunda VK "0"dır. Ancak pratikte VK'nın % 0.2-0.5 olması ideal kabul edilir. DNA ölçülen solid tmörlerde VK'nın % 2-5 olması normaldir. VK'nın daha yüksek olması durumunda bu örneğin heterojen olduğunu ya da hücre DNA'sının zarar görmüş olduğunu gösterebilir ve çok yüksek VK varlığında histogramlar incelemeye alınmaz. VK'nın yüksek olduğu durumda aynı pikin içindeki farklı iki hücre populasyonunu birbirinden ayırmak mümkün olmaz. Ancak parafinize dokuda çalışırken VK genellikle daha yüksek değerlere ulaşabilmektedir(5,176).

VK'nın % 3'ten yüksek olduğu durumlarda pikin çıkan ve inen kollarının simetrisi değer kazanır. Pikin eğimi (Gaus eğrisi) simetrikse bu tek hücre populasyonunu gösterir. Eğer Gaus eğrisinin kolları asimetrikse, değerlerin birbiri üzerine bindiği ve birden fazla sayıda hücre populasyonunun varlığı düşünülür(107,137).

Diğer bir ölçüm yöntemi kurtosisdir. Bu eğrinin pik yada düz olmasını istatistik olarak inceleyen bir yöntemdir(107,137).

Histogramdaki istatistik analizinin değeri henüz tam anlaşılama-mıştır. Büyük serilerde istatistik verilerde büyük sapmalar görülmektedir ve bu farkların anlamı açık değildir(107,137).

Hücre Siklusunu Analizi

Hücre populasyonunda DNA ölçümü hücre siklusunun bölümlerine göre 3 faza ayrılır: G1, S ve G2+M(102). Normal ancak bölünmeyen hücrelerde (G1) ve dinlenme halindeki hücrelerde (G0) DNA içeriği diploid sayıdadır (Şekil 3a). S fazı DNA'nın duplikasyon fazıdır, bu fazda yavru hücreler ana hücredeki genetik materyalin bir kopyasını alırlar. G2 ve M fazı ise DNA'nın iki katına ulaştığı fazdır. Şekil 3b'deki ilk pik kullanılan standarta ait piki ve ikinci pik G0/G1 fazındaki hücre populasyonunu ve yanındaki küçük pik ise G2+M fazındaki hücreleri gösterir. Aradaki

mesafede ise S fazındaki hücreler yer alır.

Acridine orange kullanarak hücre siklusu hakkında ek bilgiler alınabilir(42,44). Bu boya DNA ve RNA'ya farklı bağlanır ve DNA'ya bağlandığında yeşil, RNA'ya bağlandığında ise kırmızı floresans vererek aynı anda iki hücre komponentinin ölçülmesi olanağını verir. Eşik düzey altında RNA yapımı G1a ve eşik düzey üzerinde RNA yapımı ise G1b olarak anılır.

İnsan Tümörlerinde Hücre Siklusu ve DNA Ploidi Analizi

a) DNA histogramının yorumu:

Normal dokuların aksine neoplastik lezyonlarda aneuploid sayıda kromozomal sapmalar görülmektedir. Flowsitometri cihazları G1 pikinde DNA içeriği birbirinden en az % 6 farklı olan iki hücre popülasyonu olduğunu göstermektedir. Bu yöntemle karyotip anomalileri saptanmakta ancak nümerik kromozom anomalisi tespit edilen kişilerde, DNA içeriğinin de değiştiği gözlenmektedir. Metafaz saflasında yeterli sayıda tümör hücresi bulunamadığından karyotip anomalisi ile DNA içeriği ilişkisi hakkında fazla sayıda çalışma yapılamamıştır(12,35).

İnsan tümörleri DNA dağılım paternine göre basit olarak iki gruba ayrılabilir: Aneuploid ve euploid (Şekil 3c). Histogramda DNA dağılımında ana pik diploid bölgede ise tümör diploiddir. Tersine ilk pik anormal bir pozisyonda elde ediliyorsa ya da birden fazla anormal pikler mevcutsa veya siklus fazlarında normal hücre siklusundaki fazlara göre beklenen oranlardan farklı hücre dağılımı mevcutsa bu tümöral hücreler nondiploid ya da aneuploiddir. Normalde hücrelerin % 90 kadarı G1 pikinde yer alır. Aneuploid tümörler tek hücre popülasyonuna uyan tek tip DNA dağılımı gösterebileceği gibi birden fazla hücre popülasyonuna uyan, birbirinden farklı DNA içeriği olan DNA dağılım paternleri de gösterebilir. G2+M fazında anormal yüksek pikler veren histogramlara da tetraploid denir. Anormal DNA pikleri veren hücre popülasyonlarında sıklıkla diploid bölgede pikler veren bir hücre popülasyonuna da rastlanmaktadır. Eğer hücre siklusu varsa birçok G2+M piki gözlenmektedir. Histogramda diploid ve aneuploid tümörlerin farklı DNA içeriği ve dağılımı göstermesinin biyolo-

jik ve klinik anlamı olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir(56,109). Bu konu ileride irdelenecektir.

Metod kısmen basit olmasına rağmen histogramların yorumu çok zor olabilmektedir. Diploid tümörlerde kontrol ölçümleri ile tümör dokusundak ölçümlerin aynı DNA dağılımı ve VK'nı vermesine nadir rastlanır (DNA indeksi; 1.0, VK= % 2-3). Pratikte normal dokularda bile DNA dağılımında % 10 civarında sapmalar görülebilmektedir. Örneğin bir lenfosit hürce populasyonunda G1 pikinin kanal pozisyonu 40 iken daha sonraki ölçümlerde kanal pozisyonun 36 ya da 44 olması normal kabul edilmelidir. Bu farkın nedeni tam olarak bilinmemektedir. Boyaların DNA'ya farklı bağlanması, kromatinin depolanmasında farkların olması, örneğin hazırlanması sırasındaki hatalar veya henüz bilinmeyen faktörler bu farkı yaratabilir(168).

G0/G1 pikinde normalde hücrelerin % 90 kadarının yer alması ve kalanının S ve G2+M fazında dağılması gerekir. G0/G1 pikinde % 90'dan daha az sayıda hücre varlığında yeterli yorum yapılamamaktadır ve alt limitin ne olması gerektiği konusunda da kabul edilmiş bir değer yoktur. Devonec ve Klein mesane yıkama sıvılarında G0/G1 piki alt sınırının % 85 olması gerektiğini bildirmektedir(47,88). Bu alt sınırı kendine göre belirleyen bazı çalışmacılar tümör olmayan dokularda dahi % 28-38 gibi yüksek bir oranda anormal DNA dağılımı bildirmişlerdir(45,116). Karşılaştırmalı bir çalışmada flowsitometri histogramında diploid denilen vakaların % 20'sinde imaj-sitometri yöntemiyle aneuploidi tespit edilmiştir(92). Benzeri bulgular kanser efüzyonlarında da saptanmıştır(132). Dolayısıyla herhangi bir organ için normal değerler saptanmadan önce çok sayıda ölçüm yapılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Diploid histogramlarda eğer ikinci pikte (G2+M) hücrelerin % 5'den fazlası yer alırsa başka bir tartışma ortaya çıkmaktadır. Bu pikin aneuploid bir paterni mi yoksa sadece kalıcı ya da geçici bir poliploidiyi mi gösterdiği tartışmalıdır. Ayrıca karaciğer gibi bazı normal dokularda da poliploidi normal olarak bulunmaktadır(109).

Çalışılan organa, alınan örneğe, hazırlanan tekniğine, cihaza ve

araştırmacının deneyimine bağlı olarak histogramın yorumu zor ya da kolay olmaktadır. Rutin flowsitometrik yöntemle çok büyük oranda benign hücreleri içeren bir hücre populasyonunda küçük miktardaki aneuploid hücreler ölçülememektedir. Bu durumda direkt gözlem altında seçilmiş hücrelerde slide-sitofotometri yöntemiyle bu küçük hücre grubunu yakalamak da mümkün olabilmektedir. Her iki tekniğe de sahip laboratuvarlarda DNA ölçümlerinin doğruluk oranını artırmak için iki yöntemle de ölçüm yapılması önerilmektedir(55).

b) Hücre siklusu analizi:

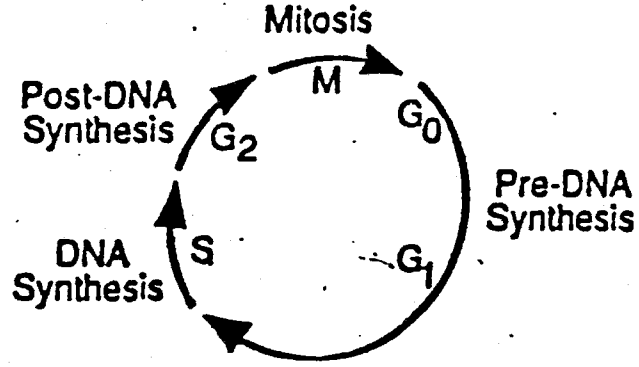
Hücre siklusu analizinin mantığı DNA sentezleyen hücre populasyonunu (S fazı) ölçerek tümör proliferasyonu hakkında bilgi sahibi olmaktır. S fazındaki hücreleri ölçmek ilk pikteki VK'sı düşük ,eğimi düşük olan iyi bir histogramda kolaydır. Ancak piklerdeki VK'sı yüksek ve eğimi yüksek olan bir histogramda değerlendirme zor olmaktadır(11,62,81).

Histogramlarda S fazının gösterilmesinde de belirlenmiş kesin bir kriter yoktur ve bazı çalışmacılar bunu kendilerine göre değerlendirmektedirler. Analizi yapanlara göre farklı S fazı değerleri elde edilebilmektedir. Ayrıca özellikle aneuploid tümörlerde siklus gösteren birçok hücre populasyonunun S fazı birbirinin üzerine binmekte ve S fazındaki hücrelerin oranlarının hesaplanması zor hatta imkansız olabilmektedir(11,62,81).

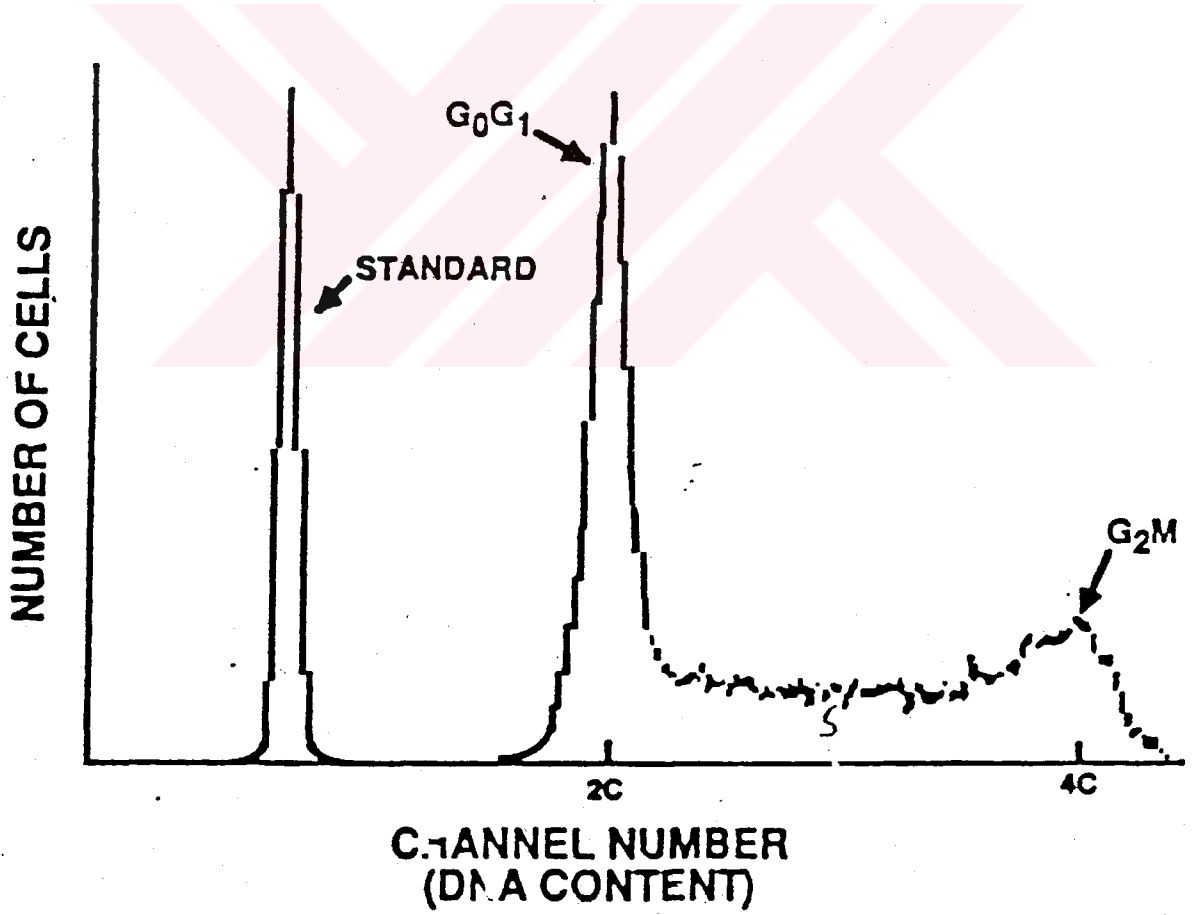
Diğer bir sorun da siklusa girmeyen ancak S fazında bulunan hücrelerin ölçümü konusudur. Bu hücrelere Sq denilmektedir(40,150).

Bu zorlukları dikkate almayan ve insan tümörlerinde S fazındaki hücre oranının arttığını bildiren çalışmalar mevcuttur(28,73). Bunun yanında son derece malign seyreden ve proliferasyon oranı ile ancak zayıf bir bağlantısı bulunan tümörler de mevcuttur, böylece S fazı analizinin tümörün klinik seyri ile ilgisi hakkında şüpheler doğmaktadır(57,67,165,118).

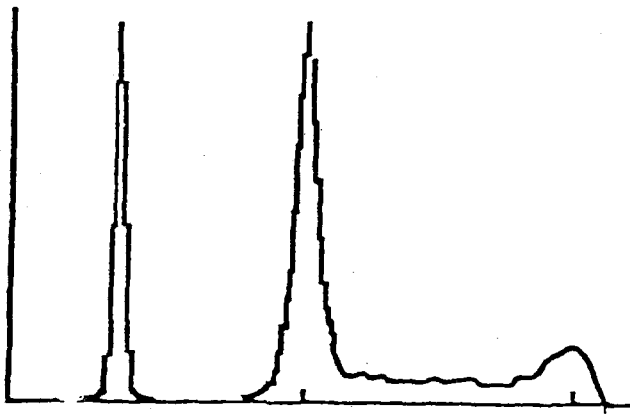
Bu konuda ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.



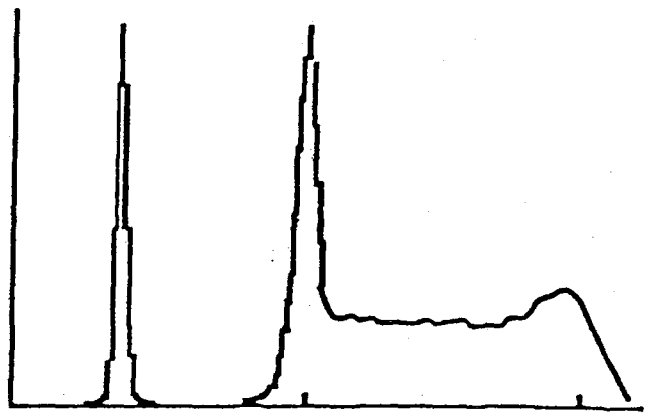
Şekil 3a : Normal hücre döngüsü



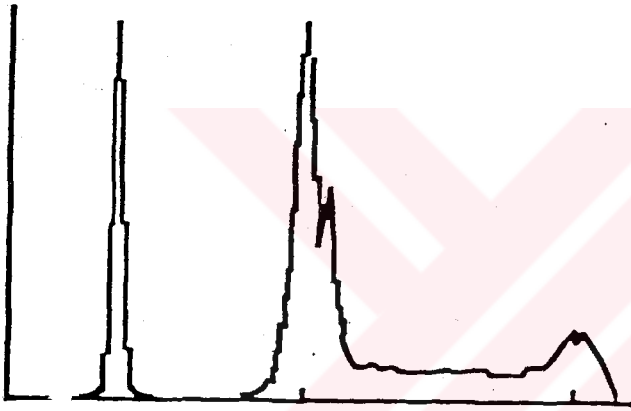
Şekil 3b : Standart hücre popülasyonuna karşı diploid hücre popülasyonu ve fazları



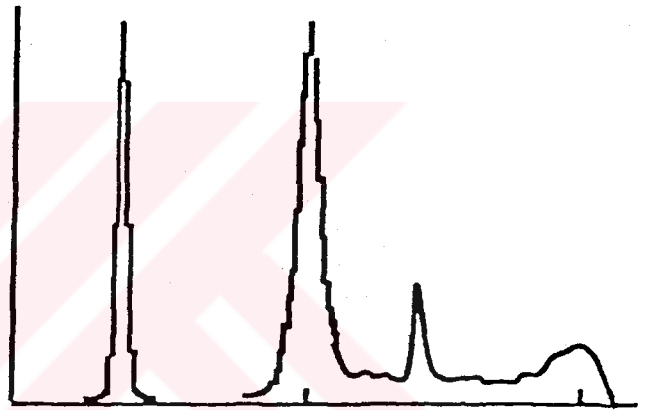
NORMAL



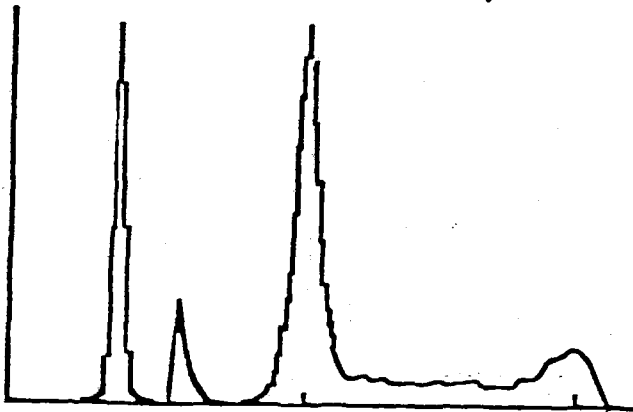
PROLIFERATIVE



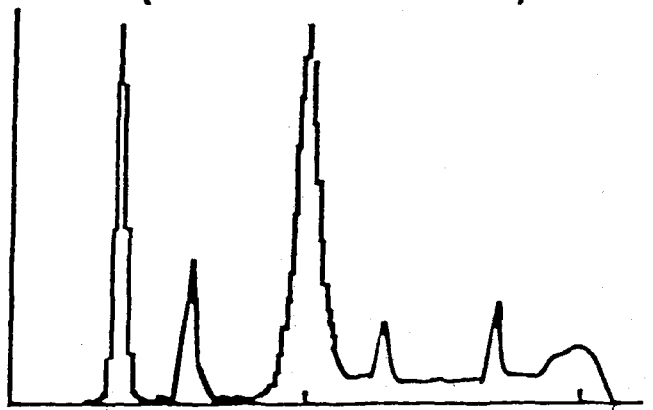
**ANEUPLOID
(NEAR DIPLOID)**



**ANEUPLOID
(HYPERDIPLOID)**

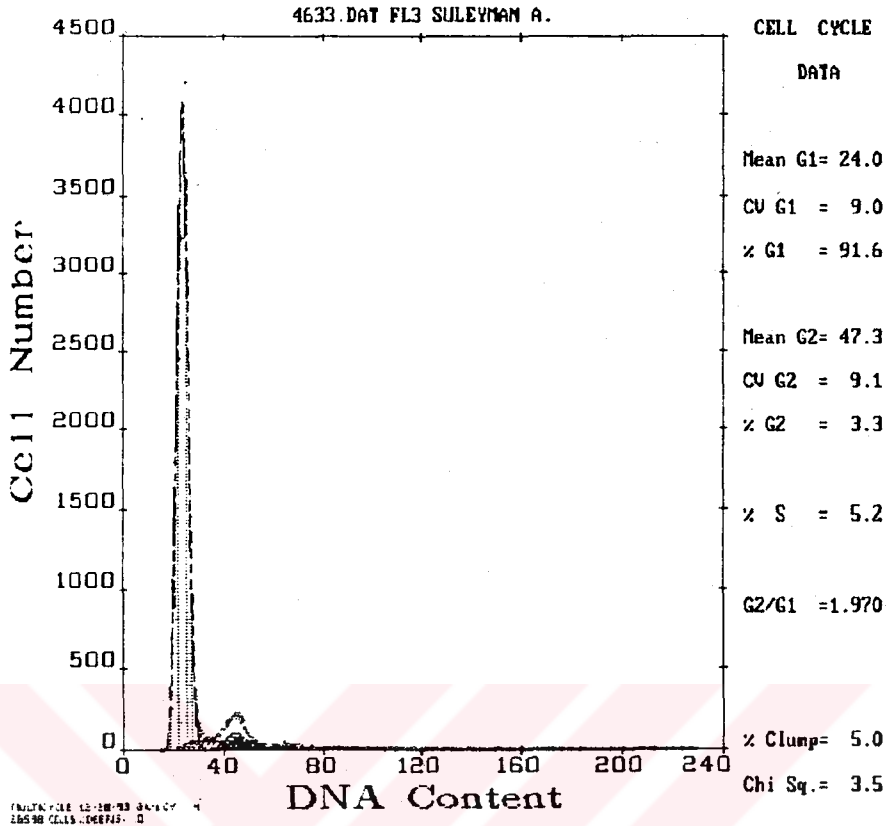


**ANEUPLOID
(HYPODIPLOID)**

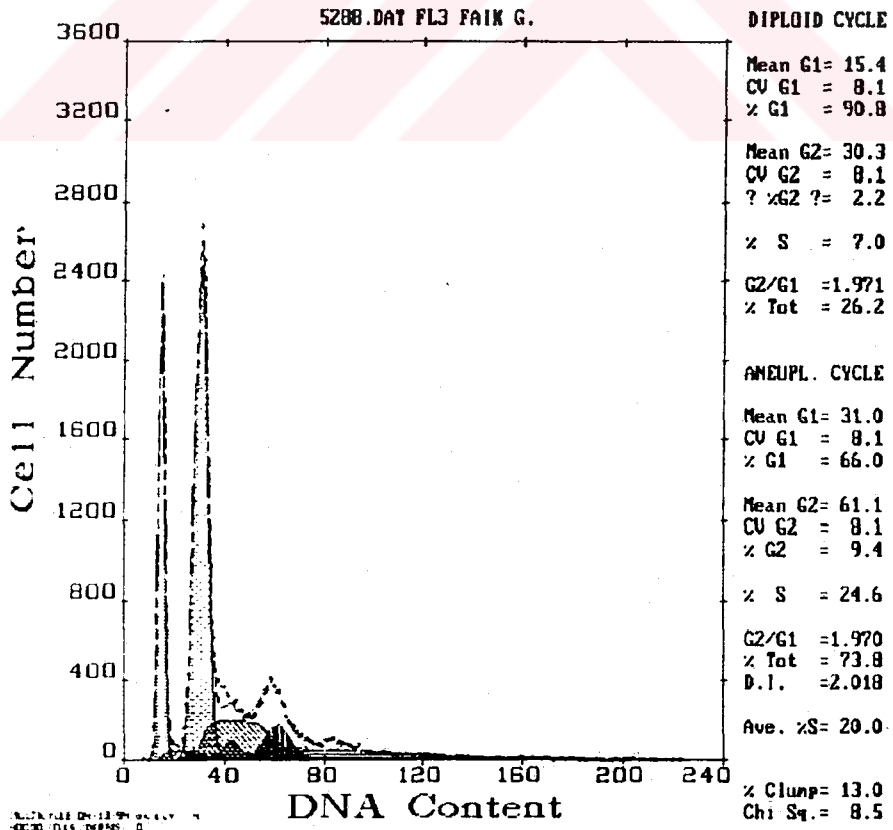


MULTIPLOID

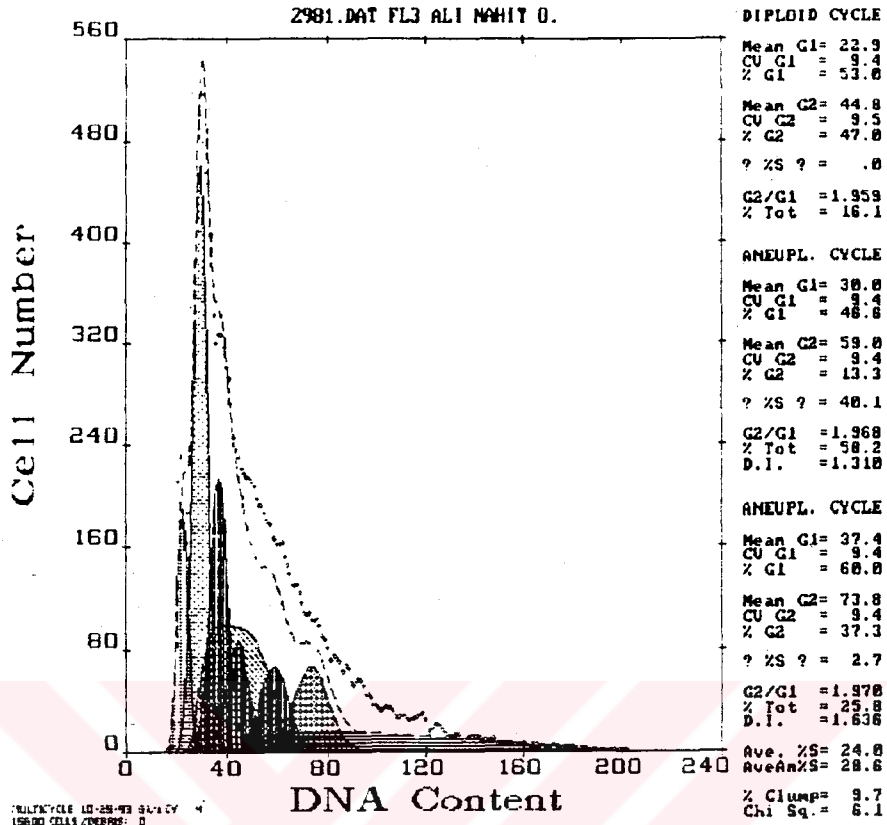
Şekil 3c



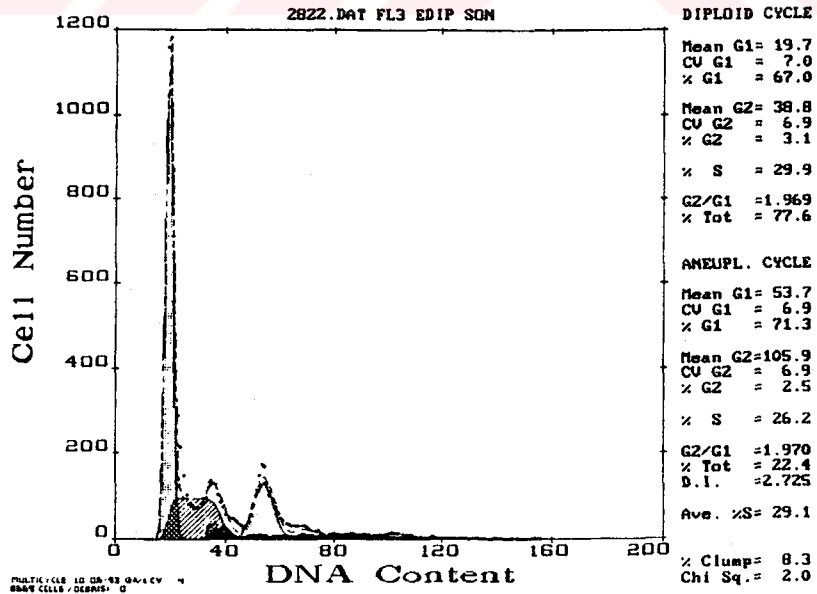
DİPLOİD HISTOGRAM ÖRNEĞİ



ANEUPLOİD HISTOGRAM ÖRNEĞİ



MULTİPL ANEUPLOİDİ ÖRNEĞİ



MULTİPL ANEUPLOİDİ ÖRNEĞİ

MATERYAL VE METOD

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalında Kasım 1992 - Şubat 1995 tarihleri arasında mesane tümörü tanısı konan 77 olgu araştırma kapsamına alındı. Kontrol grubunu non-tümöral nedenlerle sistoskopi ve biyopsi uygulanan 14 olgu oluşturdu. Hastaların yaş ortalaması 59.1 (26-82), ortalama takip süresi 16.6 aydır.

Olguların evre ve grade'e göre dağılımı tablo 5'te görülmektedir.

FCM ile DNA analizi mesane yıkantı sıvısında çalışılmıştır. Hastalardan sistoskopinin başlangıcında Ellik evakuatörü ile yaklaşık 400 cc mesane yıkantı sıvısı alınmış, bunun yarısı FCM, diğer yarısı ise sitolojik tetkik için ayrılmıştır. Sıvılar 5°C'da muhafaza edilmiş ve 8 saat içinde analiz edilmiştir. Tüm olgularda mesane yıkantı sıvısı alınan seansta biopsi alınmış ve biopsiler Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda değerlendirilmiştir.

FCM için ayrılan sıvı santrifüj edildikten sonra üst kısmı atıldı, dipte kalan çökeltideki hücre süspansiyonundan 100 µl alınarak DNA--Prep'te propidium iodide ile boyandı ve analiz edildi.

Flow sitometrik DNA analizi 5 w'lık argon lazerle donatılmış EPICS Coulter Profile II Flowcytometry cihazı (Coulter Electronics, Hialeah, Florida) ile yapıldı. Laser 500 mw sabit ışık çıkışı vermekteydi ve dal-

ga boyu 488 nm idi. Floresansa karşılık pikler şeklinde histogramlar elde edildi. 2C kanal pozisyonundaki pikler diploid pik ve onun dışındaki pikler aneuploid olarak kabul edildi. Her olguda en az 10.000 hücre sayılmasına dikkat edildi; olgulardaki ortalama hücre sayımı 21230 ± 10.829 'dur. DNA indeksi aneuploid hücre popülasyonunun ortalama pik kanalının, diploid hücre popülasyonunun ortalama pik kanalına oranı olarak tanımlandı. Analiz sonrasında Go/G1 pikinin varyasyon katsayısı (VK) % 10'un üzerinde olanlar ve her olguya ait birden fazla preparatın incelenmesinde yeterli hücre sayımı elde edilemeyenler çalışma kapsamı dışında bırakıldı. Analiz sırasında kontrol grubu olarak insan lenfositleri kullanıldı.

Bu metoda göre yeterli hücre sayımı yapılabilen ve VK değerleri % 10'un altında olan 77 olguda plooidinin ve S fazı fraksiyonunun evre ve grade ile uyumu, yüzeysel mesane tümörlerinde rekürrens ve progresyon açısından prognostik değeri araştırıldı. Hastalarda rekürrens oranı European Organisation for Research and Treatment of Cancer (E.O.R.T.C)'nin hastalık aktivitesini izleme indeksi olarak önerdiği formül ile hesaplandı.

$$\text{REKÜRRENS ORANI} = \frac{(+)\text{ resistoskopi sayısı} \times 100}{\text{Toplam izlem süresi (ay)}}$$

Evre ve/veya grade artışı progresyon olarak kabul edildi. Tümörlerin grade'ini belirlemede Ash'in tarif ettiği sistem kullanılmıştır.

Çalışmanın bir diğer bölümünü FCM sonuçlarının konvansiyonel sitoloji ile karşılaştırılması oluşturmaktadır. Alınan mesane yıkantı sıvısının yarısına konvansiyonel sitolojik tetkik uygulandı, materyel 3000 devirde 5 dakika santrifüj edildi, üstteki kısım atıldıktan sonra kalan kısım 750 devirde 5 dakika sitosantrifüje tabi tutuldu. Daha sonra dipteki çökeltiden hazırlanan preparatlar Heamatoksilen-Eozin ve May-Grünwald-Giemsas ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Sitolojik tetkik Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında, bu konuda uzman bir sitopatolog tarafından gerçekleştirildi. Bu teknikte yeterli hücre değerlendirilen 52 kanser olgusu çalışma kapsamına alındı, kanser saptanmayan 14 olgu kontrol gru-

bunu oluşturdu. Sonuçlar malignite yönünden negatif, atipik, malignite yönünden şüpheli ve malign hücre olarak bildirildi. Bunlardan ilk ikisi benign, son ikisi ise malign olarak değerlendirildi. FCM'de ise malignite kriteri olarak bir veya birden fazla hücre popülasyonunun aneuploid pik göstermesi ve/veya % 15'den fazla hücrenin G₂M fazında olması ve/veya S-fazı fraksiyonunun % 10'dan fazla olması kabul edildi. İki yöntem sensitivite ve spesifisite açısından karşılaştırıldı.

SİTOLOJİ DEĞERLENDİRİLMESİ

- | | |
|-------------------------------|---------------|
| 1- Malignite yönünden negatif | } (-) negatif |
| 2- Atipik hücre | |
| 3- Malignite yönünden şüpheli | } (+) pozitif |
| 4- Malign hücre | |

FCM - MALİGNİTE KRİTERİ

- ≥ 1 aneuploid hücre popülasyonu
- > % 15 hücre G₂M pikte
- S-fazı fraksiyonu > % 10.

Çalışmanın istatistiksel analizinde kantitatif veriler için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Student-t testi; kalitatif değerler için ise Fischer kesin olasılık testi ve Ki-kare testi kullanıldı. İstatistikler SPSS programında yapılmıştır.

B U L G U L A R

Bu çalışma mesane tümörlerinde FCM ile DNA analizinin değerini ortaya koymak için yapılmıştır. Tümörün evre ve grade'inin hem ploidi hem de S fazı fraksiyonu ile ilişkisi ayrı ayrı incelenmiştir. Ayrıca % 70 oranında rekürrens ve % 15 oranında progresyon gösterdiği bilinen yüzeysel mesane tümörlerinde (p Ta-T₁, Gr₁₋₃) ve histomorfolojik olarak aynı olup, farklı biyolojik davranış sergileyen Grade 2 tümörlerde ploidi ve S-fazı fraksiyonunun rekürrens ve progresyon açısından prognostik değeri irdelenmiştir. Çalışmanın ikinci bir kolunda mesane tümörlerinin tanı ve takibinde FCM ve konvansiyonel sitolojinin değeri karşılaştırılmıştır.

Çalışma Kasım 1992 - Şubat 1995 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Hastaların ortalama yaşı 51.9'dur(26-82). Hastaların ortalama takip süresi 16.6 aydır. FCM analizde yeterli hücre sayımı olan ($\geq 10,000$) ve (VK) değeri kabul edilebilir sınırdaki (< 10) olan 77 mesane tümörü olgusu çalışma kapsamına alınmıştır. Olguların 32'sinde evre pTa, 21'inde pT1, 8'inde TIS ve 16'sında pT₂ - T₃'dür. Grade açısından ele alındığında 7 hastada grade 1, 36 hastada grade 2 ve 26 hastada grade 3 tümör saptanmıştır. Kontrol grubunu non-tümöral ürolojik yakınması olan (BPH, Kronik Sistit, Urolithiasis) 14 olgu oluşturmuştur. FCM ile aynı zamanda sitolojik tetkik de yapılan ve yeterli hücre görülerek değerlendirilen 52 olguda, sitoloji ve FCM sonuçları karşılaştırılmıştır. Olguların evre ve grade'e göre dağılımı Tablo 5'de görülmektedir.

Tablo 5 : Olguların Evre ve Grade Açısından Sayısal Dağılımı

<i>Evre</i>	<i>n</i>	<i>Grade</i>	<i>n</i>
Kontrol	14	Kontrol	14
pTa	32	Grade 1	7
pT ₁	21	Grade 2	36
CIS	8	Grade 3	26
pT ₂₋₃	16		

PLOİDİ DEĞERLENDİRMESİ

Olgular hem evre hem grade açısından değerlendirildiğinde artan evre ve grade ile birlikte aneuploidi oranının arttığı saptandı. İstatistiksel değere uygunluğu açısından near-diploid pikler (DI= 1,2) diploid gruba, tetraploid pikler (DI: 2.0±0.1) aneuploid gruba dahil edildi. Hastalar global olarak değerlendirildiğinde aneuploidi oranı % 55 olarak bulunmuştur .

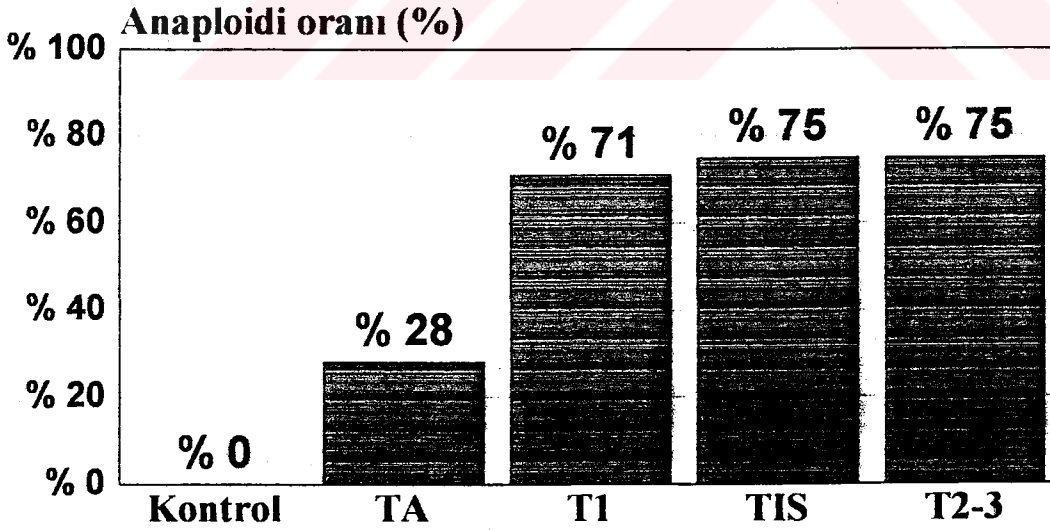
EVREYE GÖRE PLOİDİ ANALİZİ

Artan evre ile birlikte aneuploidi oranının da arttığı görüldü. Kontrol grubunda olguların tümünde diploidi saptanırken, Evre Ta tümörlerinde aneuploidi oranı % 28, T₁'de % 71, TIS'da % 75 ve T₂₋₃'de % 75 bulundu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm evrelerle olan farkın, ayrıca Ta, T₁ ve T₂₋₃ tümörlerin kendi aralarında karşılaştırıldıklarında ortaya çıkan farkın istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olduğu saptandı. TIS olguları ile kontrol grubu ve evre Ta ile olan fark istatistiksel olarak anlamlı idi, T₁ - CIS arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı. TIS ve T₂₋₃'de ploidi yüzdeleri aynı bulundu. Sonuçlar Tablo 6 ve 7'de ve Grafik 1'de özetlenmiştir.

Tablo 6 : Evre-Ploidi İlişkisi

Evre	n	Diploid		Aneuploid	
		n	%	n	%
Kontrol	14	14	100	0	0
TA	32	23	72	9	28
T ₁	21	6	29	15	71
TA+T ₁	53	29	55	24	45
CIS	8	2	25	6	75
T ₂₋₃	16	4	25	12	75

($\chi^2=29.6, p<0.001$)



Grafik 1 : Evre-Ploidi İlişkisi

Tablo 7 : Evrelerarası Ploidi Değerlerinin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Karşılaştırılan Evre	Test	P değeri	Yorum
Kontrol-Ta	Fisher kesin olasılık testi	=0.02	anlamlı
Kontrol-T ₁	Ki-kare x ² = 17.5	<0.001	ileri derecede anlamlı
Kontrol-Ta+T ₁	Ki-kare x ² = 9.8	=0.001	ileri derecede anlamlı
Kontrol-CIS	Fisher kesin olasılık testi	=0.0003	ileri derecede anlamlı
Kontrol-T _{2,3}	Ki-kare x ² = 17.5	<0.001	ileri derecede anlamlı
Ta-T1	Ki-kare x ² = 9.6	=0.001	ileri derecede anlamlı
Ta-CIS	Fisher kesin olasılık testi	=0.02	anlamlı
Ta+T ₁ -CIS	Fisher kesin olasılık testi	=0.11	anlamsız
Ta+T ₁ - T _{2,3}	Ki-kare x ² = 4.35	p=0.03	anlamlı
T ₁ - CIS	Fisher kesin olasılık testi	p=0.61	anlamsız
T ₁ - T _{2,3}	Fisher kesin olasılık testi	p=0.55	anlamsız
CIS - T _{2,3}	Fisher kesin olasılık testi	p=0.68	anlamsız

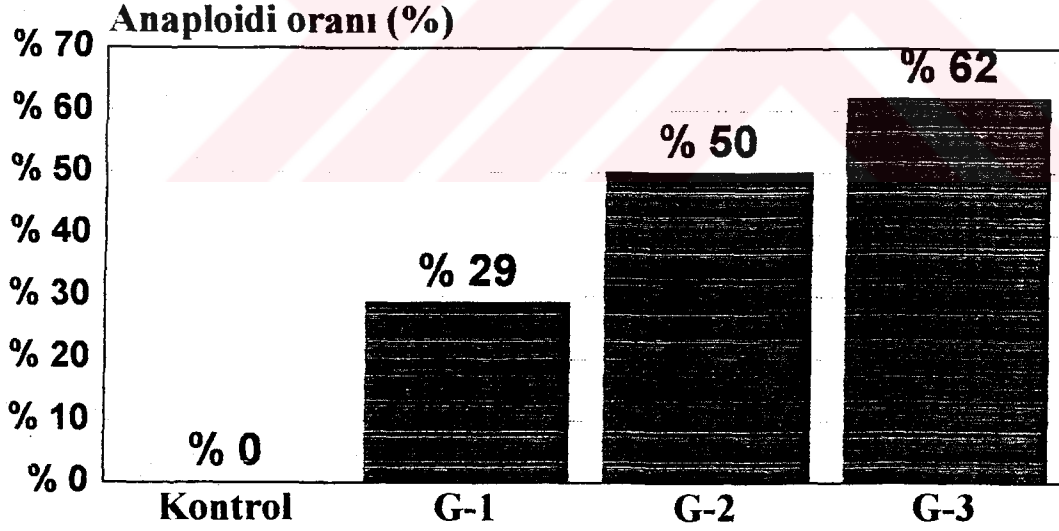
GRADE VE PLOİDİ İLİŞKİSİ

Çalışma grubundaki hastalarda, artan grade ile paralel olarak aneuploidi oranının da arttığı saptandı. Grade 1, 2 ve 3,'te aneuploidi oranı % 29, % 50 ve % 62 bulunmuştur. Kontrol grubu, grade (G) 1, 2 ve 3 birarada değerlendirildiğinde, bu artıştaki fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulundu (Ki kare testi, x²= 121, p, 0.006). Farklar gruplar arası tek tek değerlendirildiğinde kontrol grubu ile G₂ ve G₃ arasında istatistiksel olarak anlamlı bulundu; Kontrol grubu ile G₁, G₁ ile G₂ ve G₂ ile G₃ arasında belirgin farklar olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu bulgular Tablo 8 ve Tablo 9'da ve Grafik 2'de özetlenmiştir.

Tablo 8 : Grade - Ploidi İlişkisi

Evre	n	Diploid		Aneuploid	
		n	%	n	%
Kontrol	14	14	100	0	0
Grade 1	7	5	71	2	29
Grade 2	36	18	50	18	50
Grade 3	26	10	38	16	62

Ki-kare testi $\chi^2 = 12.1$ $p = 0.006$



Grafik 2: Grade-Ploidi İlişkisi

Tablo 9 : Grade ve Ploidi İlişkisinin İstatistiksel Değerlendirilmesi

<i>Karşılaştırılan Evre</i>	<i>Test</i>	<i>P değeri</i>	<i>Yorum</i>
Kontrol-Grade 1	Ki-kare	0.1	anlamsız
Kontrol-Grade 2	Ki-kare $\chi^2=10.9$	<0.001	ileri derecede anlamlı
Kontrol-Grade 3	Ki-kare $\chi^2=14,3$	<0.001	ileri derecede anlamlı
Grade 1-Grade 2	Ki-kare	0.27	anlamsız
Grade 1-Grade 3	Ki-kare	0.13	anlamsız
Grade 2-Grade 3	Ki-kare $\chi^2=0.81$	0.36	anlamsız

S-FAZI FRAKSİYONU DEĞERLENDİRİLMESİ

FCM ile DNA analizinde diploidi yanında diğer bir parametre sentez fazındaki hücre popülasyonu hakkında bilgi veren S-fazı fraksiyonudur. Olgularda S-fazı fraksiyonunun evre ve grade ile ilişkisi, yüzeysel tümörlerde ve Grade 2 tümörlerde rekürrens ve progresyon açısından prognostik değeri araştırıldı.

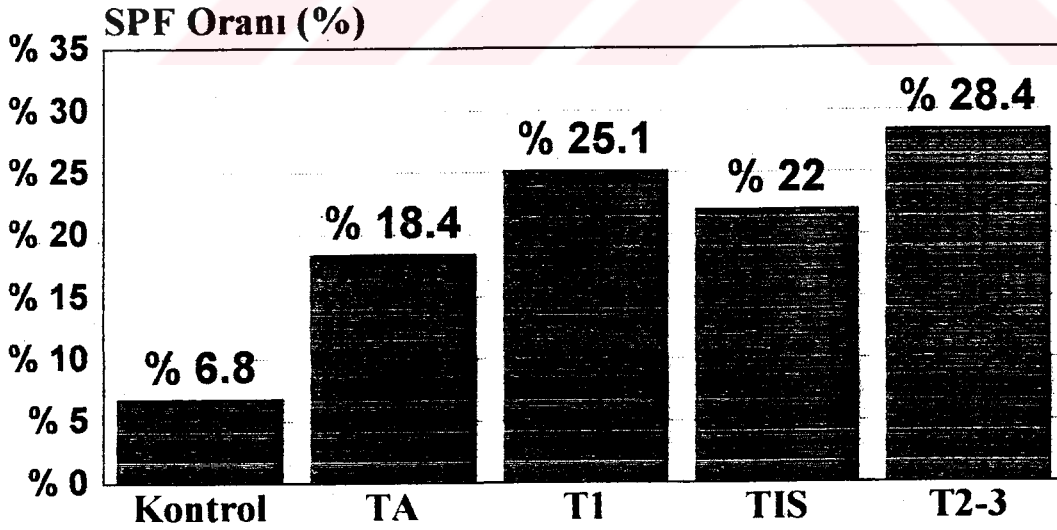
EVRE ve S-FAZI FRAKSİYONU İLİŞKİSİ

Artan evre ile birlikte S fazı fraksiyonunun (SPF) arttığı saptandı. Bu artışın istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olduğu gösterildi (ANOVA, tek yönlü varyans analizi, $F=6.7$, $p=0.0001$). Evreler kendi arasında değerlendirildiğinde kontrol grubu ile tüm evreler arasındaki farkların ve evre Ta-T₂₋₃ arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Diğer evreler arası farklar istatistiksel olarak anlamsız bulundu (Bkz Tablo 10, Grafik 3).

Tablo 10 : Evre - SPF İlişkisi

<i>Evre</i>	<i>n</i>	<i>SPF %</i>
Kontrol	14	6.8±2.2
Ta	32	18.4±9.4
T ₁	21	25.1±14.4
Ta-T ₁	16	21.0±11.9
CIS	8	22.8±13.9
T ₂₋₃	53	28.4±18.5

ANOVA- Tek yönlü varyans analizi F= 6.7 p=0.001



Grafik 3: Evre-SPF İlişkisi

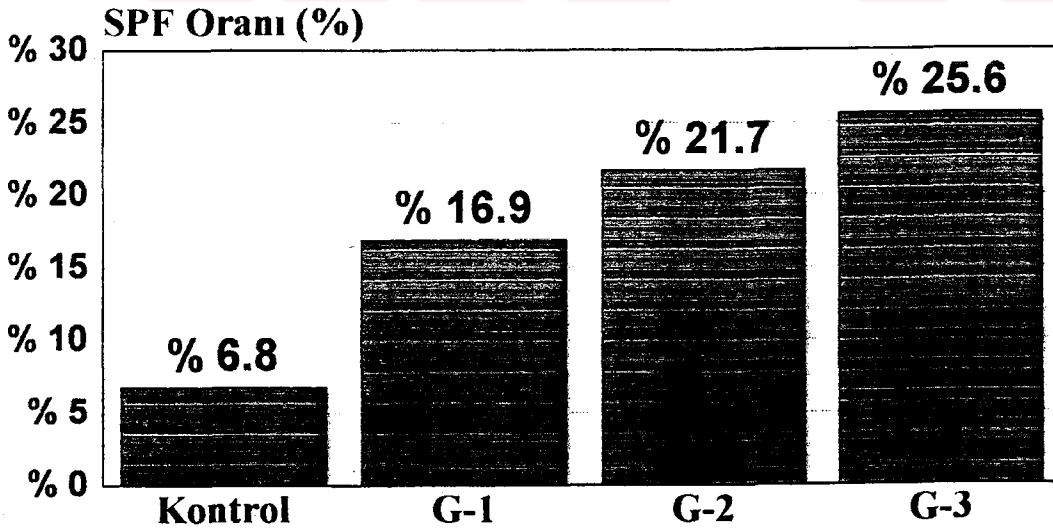
GRADE VE S-FAZI FRAKSİYONU İLİŞKİSİ

Tıpkı evrede olduğu gibi, artan grade ile de SPF'nun arttığı, bu artışın istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olduğu saptandı (ANOVA, tek yönlü varyans analizi, $F = 7.05$, $p = 0.003$). Bu farkın kontrol grubu ile Grade 2 ve kontrol grubu ile grade 3 arasındaki farktan kaynaklandığı, kontrol ve grade 1 arasında farkın istatistiksel anlamı olmadığı gösterildi (Bkz. Tablo 11, Grafik 4).

Tablo 11 : Grade ve SPF İlişkisi

<i>Grade</i>	<i>n</i>	<i>SPF %</i>
Kontrol	14	6.8±2.2
Grade 1	7	16.9±11.1
Grade 2	36	21.7±12.6
Grade 3	26	25.6±15.8

ANOVA-Tek yönlü varyans analizi $F=7.05$, $p=0.003$



Grafik 4: Grade ve SPF İlişkisi

PLOİDİ VE SPF İLİŞKİSİ

FCM ile DNA analizinin iki önemli parametresinin birbirleriyle olan ilişkileri değerlendirildi. Tüm tümör olgularına bakıldığında diploid tümörlerde ortalama SPF'u % 16.8, aneuploid tümörlerde ise % 27.3'dür ($p=0.002$). Ploidi ile SPF'nun evre ve grade ile ilişkisi Tablo 12'de verilmiştir.

Görüldüğü gibi hem Grade 2 tümörlerde, hem yüzeysel tümörlerdeki diploid ve aneuploid dağılım gösteren olguların SPF değerleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır.

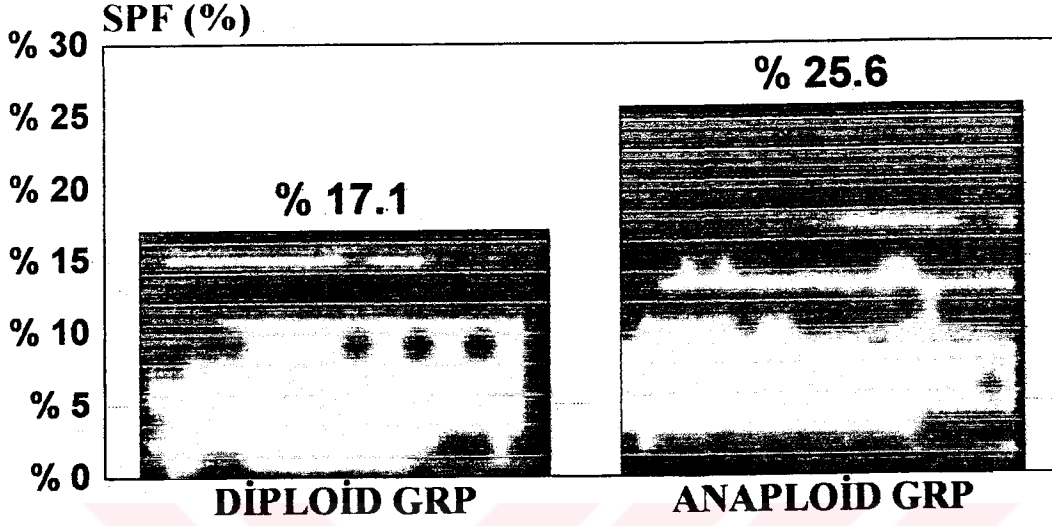
Tablo 12 : Ploidi ve SPF İlişkisi

<i>Evre</i>	<i>n</i>	<i>Diploid SPF %</i>	<i>Aneuploid SPF %</i>	<i>Student-t</i>	<i>Yorum</i>
Tüm olgular		16.8	27.3	$t=3.2, p=0.002$	anamlı
Ta	32	15.7 ± 7.8	26.1 ± 9.8	$t=3.03, p=0.005$	anamlı
T ₁	21	23.7 ± 11.0	25.4 ± 15	$t= 0,023, p=0.82$	anlamsız
*Ta+T ₁	53	17.1 ± 8.9	25.6 ± 13.3	$t=2.7, p=0.009$	anamlı
*Grade 2	33	17 ± 8.1	26.6 ± 14.8	$t= 23, p=0.02$	anamlı

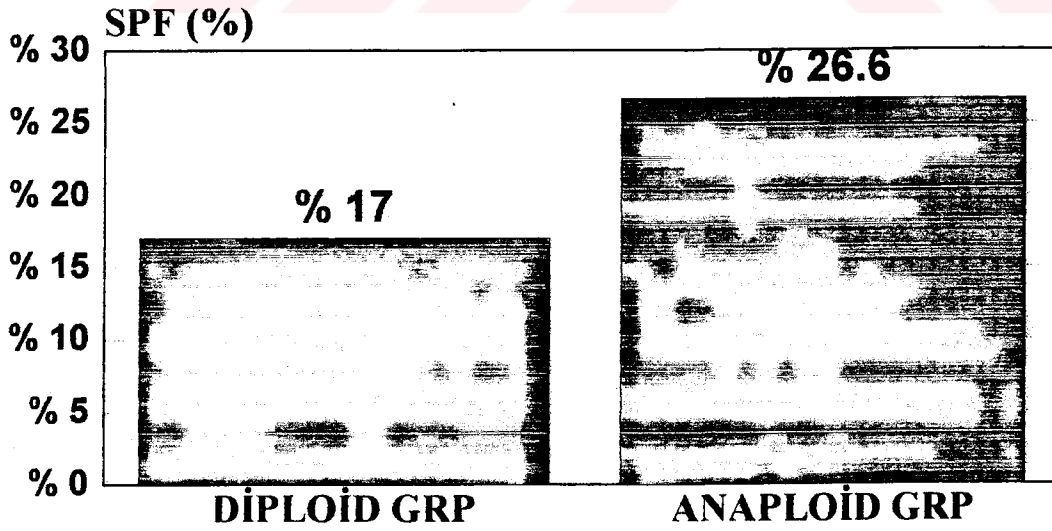
*(Bkz. Grafik 3A ve 4A)

REKÜRRENS ORANI

Bilindiği gibi yüzeysel mesane tümörlerinde karşılaşılan en büyük problemlerden biri % 70 oranında görülen rekürrenstir. Hastalardaki rekürrens E.O.R.T.C.'nin önerdiği formül ile değerlendirildi. Rekürrens açısından bilinen iki prognostik faktör tümör evre ve grade'idir, ancak bizim çalışmamızda evre ve grade ile rekürrens oranının arttığı saptanmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bunun nedeninin olgu sayısının yetersizliğine bağlı olduğu düşünülebilir (Bkz. Tablo 13 ve 14).



Grafik 3A: Yüzeysel Mesane Tümörlerinde ($T_A + T_1$) ploidi-SPF İlişkisi ($p=0.009$)



Grafik 4A: Grade 2 Tümörlerde Ploidi-SPF İlişkisi ($p=0.02$)

Tablo 13 : Yüzeyel Tümörlerde Evrenin Rekürrens Oranı Açısından Prognostik Değeri

<i>Evre</i>	<i>n</i>	<i>RI</i>
Ta	25	17.9±12.3
T ₁	15	24.1±17.8

Student t testi, t=1.3, p=0.20

Tablo 14 : Yüzeyel Mesane Tm.lerinde Grade'in Rekürrens Oranı Açısından Prognostik Değeri

<i>Grade</i>	<i>n</i>	<i>RI</i>
I	6	12.9±11.6
II	28	22.2±15.7
III	6	18.4±11.8

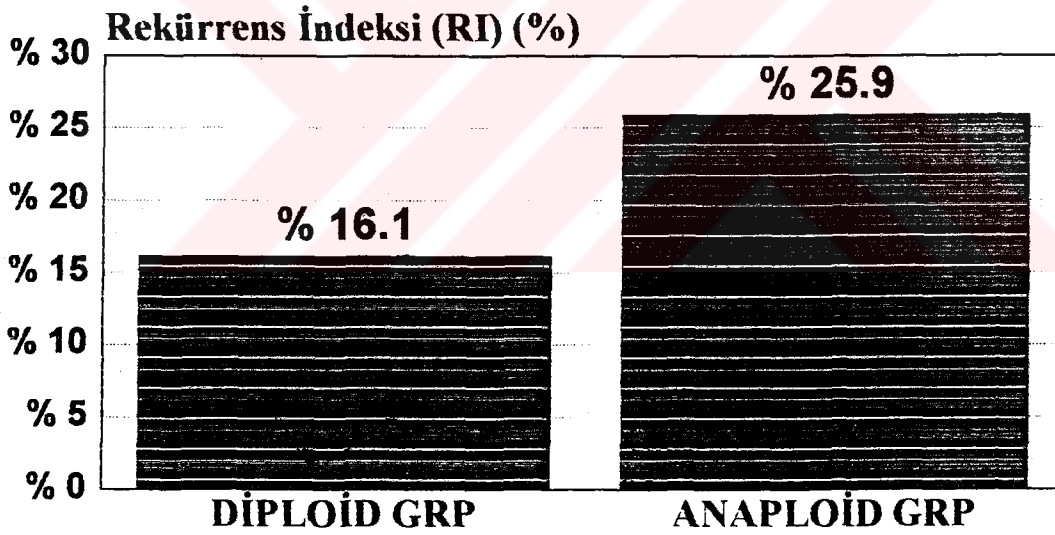
ANOVA, Tek yönlü varyans analizi, F= 1.003, p=0.36

Yüzeyel mesane tümörlerinde rekürrens indeksinin ploidi ile ilişkisi irdelendiğinde diploid ve aneuploid tümörlerde RI oranlarının farklı olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (Tablo 15, Grafik 5). Heterojen bir yapı, dolayısıyla değişken seyir gösteren Grade II tümörler de aynı açıdan değerlendirildiğinde diploid ve aneuploid tümörler arasında RI açısından fark olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterildi (Tablo 10, Grafik 6).

Tablo 15 : Yüzeyel Mesane Tümörlerinde (pTa-T₁) Ploidinin Rekürrens Oranı Açısından Prognostik Değeri

<i>Ploidi</i>	<i>n</i>	<i>Rekürrens İndeksi (RI)</i>
Diploid	23	16.1±10.8
Aneuploid	17	25.9±17.5

Student t testi, t=2.2, p=0.03 Yorum: anlamlı

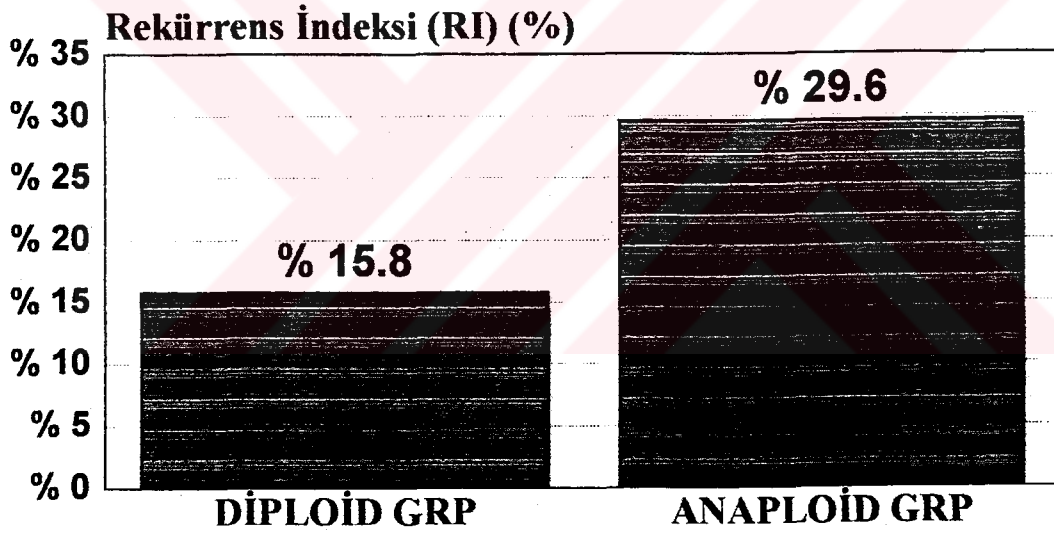


Grafik 5: Yüzeyel mesane tümörlerinde ploidi-rekürrens indeksi (RI) ilişkisi

Tablo 16 : Grade II Tümörlerde Ploidinin Rekürrens Oranı Açısından Prognostik Değeri

<i>Ploidi</i>	<i>n</i>	<i>Rekürrens İndeksi (RI)</i>
Diploid	15	15.8±9.6
Aneuploid	13	29.6±18.3

Student t testi, t=2,54, p= 0.01 Yorum: Anlamlı



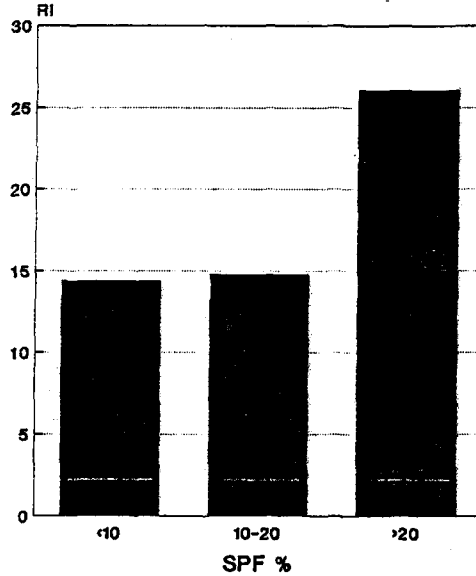
Grafik 6: Grade 2 tümörlerde ploidi-rekürens indeksi (RI) ilişkisi

SPF'nun rekürrens ile ilişkisini ortaya koyabilmek amacıyla SPF değerine göre yüzeysel mesane tümörlü olgular 3 alt gruba ayrıldı. SPF değeri 10'dan küçük olanlar; 10-20 arasında ve ≥ 20 olanlar ayrı ayrı gruplandı ve ortalama RI oranları bulundu. İlk iki grubun RI oranları aynı bulunurken, 3. grupta RI oranında belirgin bir artış saptandı ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulundu (ANOVA, tek yönlü varyans analizi, $F=4.2$, $p=0.02$) (Tablo 17).

Tablo 17 : SPF ve Rekürrens İndeksi İlişkisi

<i>SPF %</i>	<i>Olgu (n)</i>	<i>RI</i>
<10	10	14.4 \pm 12.8
10-20	11	14.8 \pm 8.0
>20	16	26.1 \pm 13

ANOVA, tek yönlü varyans analizi, $F= 4.2$, $p=0.02$ anlamlı



Grafik 7: SPF ve Rekürrens İndeksi (RI) İlişkisi

PROGRESYON

Olgularda grade veya evre artışı progresyon kriteri olarak kabul edildi. Yüzeyel tümörü olan 6 olguda progresyon izlendi, olgulardan üçünde Evre Ta, üçünde T₁ idi. TIS tanısı olan bir hastada progresyon izlendi. Progresyon gösteren olguların tümünde aneuploidi (ikisi tetraploid - aneuploid) saptandı. Olguların ortalama SPF değeri: 32.2±7.3 bulundu.

Progresyon görülen olguların dökümü Tablo 18'de gösterilmiştir.

Tablo 18 : Yüzeyel Mesane Tümörlerinde Progresyon Görülen Olgular

<i>Evre/Grade</i>	<i>Ploidi</i>	<i>SPF %</i>
Ta G ₂	aneuploid	25.3
Ta G ₂	aneuploid (tetraploid)	25.4
Ta G ₂	aneuploid (tetraploid)	22.8
T ₁ G ₂	aneuploid	36.5
T ₁ G ₃	aneuploid	38.5
T ₁ G ₃	aneuploid	40.5
TIS	aneuploid	36.5

Ortalama: 32.2±7.3

DNA İNDEKSİ VE PLOİDİ

DNA miktarı, ya da başka bir deyişle ploidi genellikle DNA indeksi (DI) ile ifade edilir.

<i>DNA İndeksi</i>	<i>Anlamı</i>	
1.0	Diploid	(46 kromozom)
0.5	Haploid	23 (kromozom)
2.0	Tetraploid	(92 kromozom)
0,5,1,2.0 değil	Aneuploid	
<1,0	Hipodiploid	(Ör: 42 kromozom)
>1.0	Hiperdiploid	(Ör: 49 kromozom)

Yüzeyel mesane tümörlerinde sık görülen DI= 1.2 near-diploid hiperploidi olarak adlandırılır

Tablo 19 : Hastaların DNA İndeksine Göre Dökümü

<i>Evre</i>	<i>n</i>	<i>DI-Ploidi</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>SPF %</i>	<i>Rekürrens İndeksi</i>
T _a	32	diploid	14	44	15.4	16.6
		near-diploid	9	28	16.3	15.4
		tetraploid	3	9	19.8	21.7
		aneuploid	6	19	25.4	28.7
T ₁	21	diploid	4	19	18.26	15.2
		near-diploid	2	9.5	19.3	17.4
		tetraploid	7	33.5	20.2	28.2
		aneuploid	8	38	31.81	24.9
T ₂ - T ₃	16	diploid	3	19	10.1	
		near-diploid	1	6	21	
		tetraploid	1	6	20	
		aneuploid	11	69	33.46	
Kontrol	14	diploid	14	100	6.8	

Tablo 20 : Olgularda Ortalama DNA İndeksi (DI) Değerleri

<i>Evre</i>	<i>DI</i>	<i>Grade</i>	<i>DI</i>
Ta	1.2	I	1.2
T ₁	1.8	II	1.4
CIS	1.8	II	1.7
T ₂₋₃	1.7		

Görüldüğü gibi near-diploidinin düşük evre ve gradeli tümörlerde daha sık bulunduğu saptandı. Ayrıca Tablo 19'da görüldüğü gibi ortalama SPF ve rekürrens indeksi değerleri near diploid tümörlerde diploid tümörle yakın değerlerdedir. Öte yandan tetraploid tümörlerde SPF ve RI değerleri aneuploid tümörlere yakın bulunmuştur. Tetraploidinin bir aneuploidi formu olduğu, bu gruptaki tümörlerde klinik seyrin diğer aneuploid tümörlere göre daha iyi olduğu bilinmektedir. Near-diploid tümörlerin diploid veya aneuploid olarak hangi grupta inceleneceği ise açıklık kazanmamıştır. Kanımızca literatürde bu grubun üzerinde henüz yeterince durulmamıştır. Bulgularımız ışığında istatistiksel analizler yapılırken near-diploid tümörler diploid, tetraploid tümörler aneuploid gruba dahil edilmiştir.

FCM ile KONVANSİYONEL SİTOLOJİNİN KARŞILAŞTIRMALI DEĞERİ

Aynı yıkantı sıvısında FCM ve konvansiyonel sitolojik analiz yapılan ve sitolojide yeterli hücre görülen 52 olgu değerlendirme kapsamına alındı. Kontrol grubunu non-tümöral ürolojik yakınması olan 14 olgu oluşturdu. FCM değerlendirmede SPF değerinin > % 10 olması malignite kriteri kabul edildiğinde sensitivite % 89, edilmediğinde ise % 79 olarak saptandı; bu iki durumda spesifisite değerleri sırasıyla % 80 ve % 93 bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda SPF'nun evre ve grade ile uyumlu bulunduğu ve rekürrens indeksi ile anlamlı ilişkisi olduğu gözönüne alındığında; ayrıca bizce önemli olanın tümörü olan olguyu atlamamak, yani sensitivite

yüksekliğinin olduğu hatırlandığında SPF'unun bir kriter olması gerektiği kanısına varılmıştır. Sitolojinin sensitivitesi % 60 spesifitesi % 93 bulunmuştur (Bkz. Tablo 21).

Tablo 21

	<i>Sensitivite %</i>	<i>Spesifite %</i>
FCM	89	80
Sitoloji	60	93
FCM + Sitoloji →	Sensitivite % 96	

Her iki yöntemin sensitivitesinin tümörün grade'ine göre dağılımı Tablo 22'de özetlenmiştir.

Tablo 22

	<i>Sensitivite</i>	
	<i>Sitoloji %</i>	<i>FCM %</i>
Grade I	50	83
Grade II	58	87
Grade III	54	100

Çalışmadaki yanlış pozitif ve yanlış negatiflik oranları Tablo 23'de özetlenmiştir.

Tablo 23

	<i>Yanlış Negatif</i>	<i>Yanlış Pozitif</i>
FCM	% 9	% 29
Sitoloji	% 40	% 7

T A R T I Ő M A

Güncel histopatolojik değerlendirme metodları, mesane kanserinin biyolojik özelliklerini bütün açıklığı ile ortaya koymakta yetersiz kalmaktadır(14). Ayrıca klinik olarak evre diye tanımlanan, malignitenin grade ve invazyon derecesi arasındaki ilişki de mutlak değildir(64). Grade 1 tümörler nadiren invazyon gösterirken, grade 3 tümörlerin çoğu invazivdir(172). Hastaların çoğunluğunu oluşturan grade 2 tümör grubundaki lezyonlar hem invaziv, hem noninvaziv olabilir; bu grupta morfoloji ve tümör progresyonu arasındaki ilişki de daha zayıftır(17). Klinikte evrelemede halen bilinen zorluklar vardır(141) ve gerçek patolojik evreleme ile uyumsuz olduğu sıklıkla görülebilmektedir(87). Bu nedenlerden dolayı, özellikle grade 2 tümörlerde olmak üzere, malignitenin yeni objektif kriterlerini bulmak için, yeni ilave yöntemlere gereksinim vardır .Bu yeni prediktif parametrelerin aranmasında araştırmacıların ilgisi sitogenetik ve kantitatif hücresele DNA analizi konusunda yoğunlaşmıştır.

Son 35 yıl içinde, neoplazik gelişim için sitogenetik anomalinin şart olmadığı ancak insandaki çoğu kanserlerde kromozomal bozuklukların olduğu açıkça ortaya konmuştur(121). Bu sitogenetik değişikliklerin genellikle randomize olduğu düşünölmektedir, ancak modern tekniklerle, neoplazmalarda spesifik karyotipik anomalilerin varlığı gösterilmiştir. Dolayısıyla tümör sitogenetiği kanserin tanısı ve muhtemelen prognozunda önemli rol oynamaktadır(17,19,158). Bugüne kadar yapılan sitogenetik araştır-

maları nümerik ve yapısal kromozom bozukluklarının sık görüldüğünü ortaya çıkarmıştır(111,112,144,145); kromozomun primer moleküler substratı DNA olduğuna göre, bu bozukluklar da kendilerini hücrenin DNA içeriğinde meydana gelen değişiklikle ortaya koyarlar. Bu nedenle nuklear DNA içeriği genomik anomalileri değerlendirmede önemli bir göstergedir. Flow sitometrinin kullanıma girmesiyle hem bu tip araştırmalardaki iş gücü azalmış hem de daha kesin ve objektif sonuçlar alınmaya başlanmıştır(61).

Mesaneenin değişici epitel hücreli karsinomu Amerika Birleşik Devletlerinde (A.B.D.) sıklık açısından genitoüriner kanserler arasında ikinci sırada yer almaktadır, 1990 yılında bu hastalığa bağlı 50.000 yeni olgu ve 10.000 ölüm bildirilmiştir. İlk tanı konduğunda mesane kanserlerinin yaklaşık % 70'i yüzeysel tümörlerdir (klinik evre Ta veya T₁). Bu olguların yaklaşık % 70'inde, takip eden 5 yıl içinde nüks tümör gelişirken, % 15-25 olguda ise invaziv mesane kanseri gelişecektir. Prognoz, adele invazyonu gösteren olgularda, yüzeysel tümör görülen olgulara göre çok daha kötüdür, bu nedenle progresyon gelişecek olguları önceden saptayıp daha radikal tedavi uygulayabilmek çok önemlidir; ancak bugün için elimizde bu konuda çok güvenilir bir marker bulunmamaktadır.

% 50-70'lik bir rekürrens oranı ve % 20'lik bir progresyon oranı hastanın çok uzun yıllar, hatta genellikle ömür boyu yakın takibini gerektirir. Bu, hastanın sıklıkla sistoskopi gibi invaziv bir girişime maruz kalmasına yol açtığı gibi, hastaya önemli bir maddi yük de getirir. Nüksleri azaltıp progresyonu önlemek için uygulanan intravezikal instilasyon tedavisi iyi hasta kooperasyonu gerektiren, pahalı ve ciddi yan etkileri olan bir yöntemdir. Dolayısıyla yüzeysel mesane tümörü tedavisi sıklıkla üroloğu ikileme düşürmektedir. Burada "riskli" hastayı "risksiz" hastadan ayırdedecek güvenilir markerlara ihtiyaç vardır. Bu konuda etkinliği bilinen prognostik faktörleri tümörün sayısı ve boyutu, papiller veya solid olması, evre ve grade'i ve tümöre komşu mukozanın durumudur(1,52,69). Bunların arasında hastalığın evresi muhtemelen en iyi prognostik faktördür. Ta lezyonlarda progresyon riski yaklaşık % 9 iken, T₁ grade 3 lezyonlarda yaklaşık % 43'e çıkar(69). Tümöre komşu mukozada karsinoma in situ (TIS) varlığı invaziv

hastalık gelişme riskini % 80'e çıkarır, ancak bu bilginin klinik değeri sınırlıdır, zira yüzeysel tümörlerin yalnızca % 10'una TIS eşlik etmektedir.

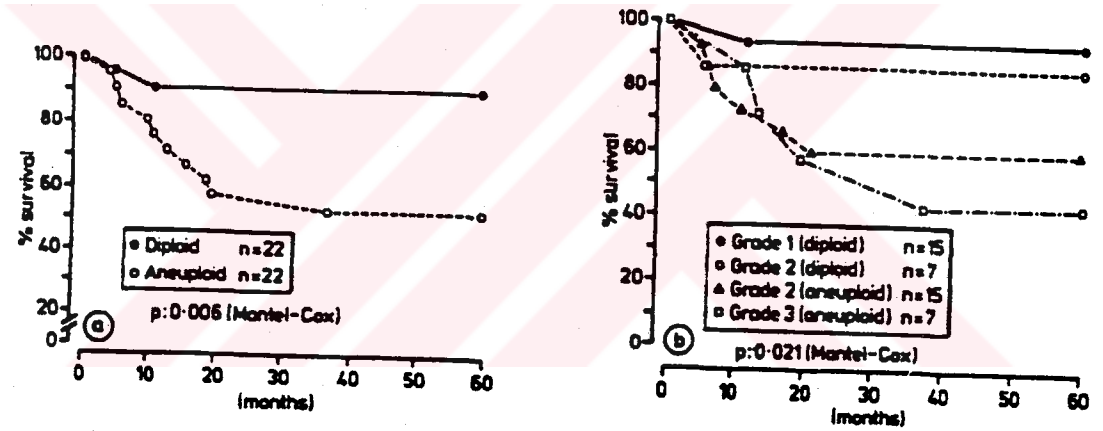
Yüzeysel mesane tümöründe prognostik bilgilerimizi geliştirmek amacıyla kartoyipik analiz, kan grubu antijenleri ve tümör hücrelerinin ışık ve elektron mikroskopi ile morfolojik değerlendirmesi gibi pek çok parametre incelenmiştir. Son yıllarda FCM ile DNA analizinin önemli prognostik bilgiler verdiği ortaya konmuştur. Her yeni teknolojik gelişme ürolojyal tümörleri daha iyi anlamamızı sağlamaktadır ve hekimler doğal iç güdüleri ile bu yeni yöntemleri hızla güncel klinik kullanıma sokmak istemektedirler. Maalesef, kromozom analizi, elektron mikroskopi, karsinoembriyjenik antijen için immunoperoksidaz reaksiyonu ve kan grubu antijenleri gibi yöntemlerle olan deneyimler bu yöntemlerin deneysel düzeyde değerli bir yöntem olduklarını ancak hasta uygulaması için, zor pahalı ve yeterince değerli olmadığını göstermiştir(115). Yeni prognostik bir yöntemin pratikte hekimin uygulama alınan girebilmesi için basit, tekrarlanabilir olması ve mevcut sitolojik ve histolojik incelemelere ilave bilgi sahibi olmamızı sağlaması gereklidir. Biz bu çalışmanın sonucunda FCM'nin böyle bir yöntem olduğu ve artık ülkemizde de araştırma laboratuvarlarına sınırlı kalmaktan çıkıp, günlük uygulamada daha sık kullanılır hale gelmesinin gerektiği kanısına vardık. FCM yardımıyla yüzeysel mesane tümörlü olgularda riskli ve risksiz hasta ayırımı yapılabildiği taktirde, hekim ilgisini birinci gruba yoğunlaştırıp bu hastalarda rekürrens ve progresyonu önlemeye yönelik tedbirleri alırken, ikinci gruptaki hastaların da daha sorunsuz ve konforlu bir yaşam sürmelerine izin verilebilir(139).

Çalışmamızda FCM ile ploidi analizinin sonuçlarının tümörün grade ve evresi ile arasında anlamlı korelasyon olduğu sonucuna varılmıştır. Non-tümöral ürolojik yakınması olan olguların tümünde diploidi saptanmıştır. Grade 1 tümörleri genellikle diploid yapıda, grade 3 tümörlerin ise ağırlıklı olarak aneuploid yapıda olduğu görülmüştür. Aneuploidi oranı grade 1,2 ve 3 için sırasıyla % 29, % 50 ve % 62'dir (p=0.006). Evre açısından bakıldığında tümörün invazyon derecesinin artmasıyla orantılı olarak

aneuploidi oranının arttığı saptanmıştır. Evre Ta, T₁ ve T₂₋₃'de aneuploidi oranı sırasıyla % 28, % 71 ve % 75'dir. TIS olgularında da aneuploidi oranı invaziv tümörlerle aynı değerdedir, yani % 75'tir.

Blomjous(19) tüm grade 1 tümörlerde diploidi, grade 3'lerde aneuploidi, 34 grade 2 hastasının 13'ünde aneuploidi bildirmiştir. Chin(27), 140 olguluk çalışmasında grade 1 tümörlerin tümünde diploidi saptamış, aneuploidi oranını grade 2 ve 3'de % 30 ve % 76.9 olarak bildirmiştir, aynı çalışmada evre Ta'da aneuploidi saptanmazken, T₁, T₂ ve T₃'de % 27, % 71.4 ve % 75 oranında aneuploidi saptamıştır. Bu araştırmacı mukozaya sınırlı (Ta) tümör ve lamina propria invazyonu (T₁) gösteren iki grup arasındaki anlamlı aneuploidi farkının önemini vurgulamıştır, bu fark bizim çalışmamızda çok daha çarpıcıdır. Litz(162) Ta e T₁ tümörlerin yüzeysel tümörler adı altında birlikte sınıflandırılmasına karşı çıkmakta ve T₁ tümörlerde hastanın "kaderini değiştirecek bir potansiyel farklılık" olduğunu savunmaktadır. Tribukait(153) mesane tümörlerinde FCM ile ilgili çalışmalarını yaklaşık 15 yıldır sürdürmektedir. 100 olguluk bir çalışmada mesane tümörlerinin ploidi derecesine göre diploid ve aneuploid olarak alt gruplara ayrılabilceğini savunmuştur. T₁ tümörlerin % 36'sında ve bir olgu dışında T₂, T₃, T₄ ve TIS tümörlerin tümünde aneuploidi saptamıştır. grade 1 ve 3 tümörlerde üniform bir davranış olduğunu, grade 1 tümörlerin çoğunun diploidi, grade 3 tümörlerin ise çoğunun aneuploidi gösterdiğini; diploidi ve aneuploidi arasındaki ayırıcı çizginin ise grade 2 tümörlere isabet ettiğini bildirmiştir. Grade 2 olgularda üçte iki diploidi, üçte bir aneuploidi bildirmiştir(159). Tribukait grade 2 tümörlerin 2a ve 2b olmak üzere iki alt gruba ayrılabilceğini savunmakta; minör atipi ve invazyon olmayanlara grade 2a, normal hücre yapısında belirgin sapma gösteren, invaziv veya muhtemel invaziv olanlara ise grade 2b demektedir. Grade 2a tümörlerde malign sitolojisi olan hiçbir olgu yoktur ancak aneuploidi gösteren birkaç olgu saptanmıştır. Subgrup grade 2b'de ise malign sitolojisi olan olguların varlığının yanısıra, DNA aneuploidi oranı da 2a'dan fazladır. Far-sun ve ark.(53)'da grade 2 tümörlerin(1) diploid ve(2) aneuploid olmak üzere iki alt grubu ayrılabilceğini önermektedir. Caratero ve ark.(25) aneuploid DNA yapısı gösteren grade 2 olgularda hastalığın agrevasyon oranı-

nı % 50, diploidlerde ise % 9 olarak bildirmektedirler. Hamano ve ark(63) bazı grade 2 tümörlerin grade 1 komponentine, bazılarının ise grade 3 komponentine sahip olduklarını savunmaktadır; grade 2 tümörlerdeki aneuploidi oranları % 58.9'dur; grade 1 komponentine sahip olgularda aneuploidi oranları % 3.8, grade 3 komponenti olanlarda ise % 75.5 olarak bildirilmiştir. Şekil 4'de grade 2 diploid tümörlerin grade 1; grade 2 aneuploid tümörlerin de grade 3 tümörler ile sağkalım açısından paralellığı göstermektedir(19) (Bkz Şekil 4).



Şekil 4: (Blomjous et al., 1988)

Bu bulguların ışığında yazarlar, grade 2 tümörlerde, histolojik gradelemede, patoloğun subjektif yorumuna açık, farklı hüresel atipi bulguları olduğu, dolayısıyla FCM'nin objektif bir yaklaşım ile bu farklı yorumları ortadan kaldıracabileceği kanaatine varmışlardır. Bu grubun 140 olguluk çalışmasında grade ve aneuploidi arasında da korelasyon bulunmuş, grade 0 (papilloma), grade 1, 2 ve 3 için aneuploidi oranı sırasıyla % 20, % 25.6, % 57.7 ve % 95.7 olarak bildirilmiştir. Yüzeysel tümörlerdeki aneuploidi oranları % 23.6, invaziv tümörlerde % 83.5, TIS olgularında ise bu iki değer arasında % 68.2'dir.

Bizim çalışmamızda 36 grade 2 olgusu vardır ve enteresan olarak 16 olguda (% 50) diploidi, 16 olguda (% 50) aneuploidi saptanmıştır. Bu Tribukait'in diploidi-aneuploidi çizgisinin grade 2 tümörlerden geçtiği hipotezini tamamen desteklemektedir. Grade 2 tümörler diploid ve aneuploid olarak iki grupta incelendiğinde diploid olgularda rekürrens indeksi 15.8 iken, aneuploid grupta 29.6 bulunmuştur. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.01$). Ayrıca progresyon gösteren 4 grade 2 olgunun hepsinde DNA yapısı aneuploiddir. Bu bulgular sonucunda histopatolojik değerlendirmesi aynı ancak biyolojik davranışı heterojenite gösteren ve bu açıdan da çok ilginç bir grubu oluşturan grade 2 mesane tümörlerinin prognostik açıdan FCM DNA analizi ile iki ayrı grupta incelenmesi gerektiği kanaatine vardık. Grade 2 diploid tümörler düşük riskli hastaları oluştururken, aneuploid grade 2 tümörler yüksek riskli hastaları oluşturmaktadır. Birinci gruptaki olguların takibinde sistoskopi sayısı azaltılıp, takipte idrar sitolojisi ve idrarda FCM gibi non-invaziv yöntemler kullanılarak hastaya daha konforlu bir yaşam sağlanırken, hastaya yüklenen maddi yük de önemli oranda azaltılmış olacaktır. Öte yandan aneuploidi gösteren grade 2 olgularda daha yakın takip ve intravezikal instilasyon tedavisi düşünülmelidir.

Hussain Al-Abadi ve ark.(78) 130 olguluk çalışmalarında evre ve grade ile ploidi arasında anlamlı ilişki bildirmişler, grade 1 tümörlerde prognoz genelde iyi ve grade 3 tümörlerde genelde kötü olduğu için bu gruplarda ploidi tayininin pratikte çok fazla bir katkısının bulunmadığını, ancak heterojen bir dağılım gösteren grade 2 tümörlerde çok değerli bir prognostik faktör olduğunu, bu grubun aneuploid (biyolojik olarak agresif) ve diploid (biyolojik olarak daha az agresif) iki alt grupta incelenmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada sağkalım açısından evre ve grade ile karşılaştırıldığında DNA ploidi tayininin en anlamlı prognostik faktör olduğu ortaya konmuştur. 9 yıllık takipte diploid olgularda hiç progresyon veya metastaz saptanmazken, multiple aneuploidi saptanan olgularda 6 ile 36 ay arasında rekürrens ve progresyon saptandığı bildirilmiş, diploid ve aneuploid iki grup arasındaki rekürrens ve progresyon oranı farkı istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$).

Bizim çalışma grubumuzda evre ve grade'in prognostik değeri istatistiksel olarak ispatlanamamıştır, bunun nedeninin hasta sayısının yetersizliğine bağlanabileceği düşünülmüştür. Ancak bunun yanında FCM'nin prognostik değerinin ispatlanmış olması onun evre ve grade'e üstünlüğünü ortaya çıkartmaktadır.

Blute ve ark(20) parafin bloklarda yaptıkları arşiv çalışmasında FCM'nin 15 yıllık uzun döneme ait prognostik değerini ortaya koymuşlardır. Bu araştırmacılar da diğerlerine paralel olarak DNA içeriği ile histolojik grade, patolojik evre ve klinik seyir arasında anlamlı korelasyon bildirmişlerdir. Yüksek grade ve yüksek evreli tümörlerde kötü sağkalımı gösteren hasta grubu aneuploidi varlığı ile saptanabilmiştir.

DeVere White ve ark.(46) Ta tümörlerde FCM'nin prediktif değerini irdeledikleri çalışmada tüm aneuploid olgularda rekürren hastalık saptamışlardır. Bu araştırmacılar ilginç bir noktayı ortaya çıkartmışlardır; tümörlü hastaların takibinde ploidi paterninin değişiklik gösterdiğini, yani diploid tümörlerin aneuploidi yönünde değişebileceği, bunun tam tersinin de olabileceğini ortaya koymuşlardır. Aneuploidi gösteren olgular içinde, 1 defadan daha sık aneuploid histogram görülenlerin üçte ikisinde invazyon görülürken bu oran 1 kez aneuploidi saptanan grupta üçte birdir, buradan yola çıkarak yazarlar tekrarlayan aneuploidinin progresyon açısından çok önemli bir bulgu olduğunu savunmaktadırlar. Sonuçta bu grubun kanaati Ta tümörlerde FCM'nin klasik evre ve grade'e göre çok daha önemli bir prognostik faktör olduğu, aneuploidi gösteren olgularda rekürrens, 2 veya daha fazla aneuploidi gösterenlerde progresyon beklenmesi gerektiği, öte yandan diploid tümörlerde FCM'nin prediktif değerinin daha az olduğu ve bu grupta ploidi dışında bir flow sitometrik parametre bulmanın gerektiğidir. Bu ikinci parametre bize göre giderek önem kazanan S-fazı oranıdır ve ileride ayrıca ele alınacaktır. De Vere White ve ark.(46) Ta lezyonlarda intravezikal kemoterapi endikasyonlarını inisyal tümörün ploidi yapısına göre koyduklarını belirtmektedirler.

Murphy ve ark.(116) pekçok araştırmamızın aksine FCM'nin klasik grade'e ilave herhangi prognostik bir değeri olmadığını düşünmektedir. Yazarlar bunu çoğu urotelyal tümörün DNA içeriği açısından homojen olmasına bağlamaktalar. Grade 1 tümörlerin morfolojisinde hafif atipi mevcuttur, belki de çoğu fibrovasküler pedikül olmasa atlanabilecek oluşumlardır, dolayısıyla çoğunun DNA içeriği normaldir. Grade 3 tümörler ve invaziv tümörlerin de bilindiği gibi nuklear yapısında belirgin anomali vardır ve DNA içerikleri normalden sapma gösterir. Bu nedenle bu bahsedilen grup tümörlerde ploidi tayininin çok fazla yardımcı prognostik değeri olmayacağını savunan Murphy'nin esas diğer araştırmacılardan farklı görüşü grade 2 tümörlerdedir. Murphy, grade 2 tümörlerde de DNA içeriğinin prognostik bir değerini saptayamadıklarını ve bunun bir hayal kırıklığı olduğunu bildirmektedir. Yazar ayrıca aneuploidi görülen grade 1 olgularda ve diploidi görülen grade 3 olgularda da klinik seyir açısından ploidi tayininin bir katkısı olmadığını saptamıştır; buradan yola çıkarak anormal DNA içeriğinin her zaman neoplazi veya agresif davranış anlamına gelmediği, DNA yapı bozukluğu olan pekçok hücrenin belki de anormal kromozom yapısı nedeniyle replikasyon yapamazken, daha normal DNA'sı olan hücrelerin daha hızlı çoğalabileceği fikrini ortaya atmıştır. Yazara göre aneuploidinin mutlak agresif davranış ile eş anlamlı olmadığının en iyi ispatı karsinoma in situ olgularıdır.

TIS olgularında hemen her zaman aneuploid DNA yapısı saptanmasına rağmen, bazı olgularda invazyon geğ olurken, bazılarında hiç olmaz. Murphy ve ark.'nın bu görüşleri literatürle ve bizim olgularımızla genellikle ters düşmektedir, ancak konuya çok farklı bir bakış açısı getirdiği de gerçektir. Bu çalışmada rekürrenslerde ploidi değişikliği ve S fazı oranlarına değinilmemiştir.

Silverio ve ark.(139) yüzeysel tümörlerde evre ve grade'in ayrı ayrı değerlendirildiklerinde, prediktif açıdan değersiz olduklarını bildirmiştir. İki parametre kombine edildiğinde T₁ G₃ tümörlerde progresyon oranını % 42 iken Ta G₁'de % 4'dür. Ta-T₁ G₂ tümörlerde ise evre ve grade'in yetersiz olduğunu düşünerek bu konuya özellikle eğilen yazarlar FCM'nin

bu grupta progresyon açısından değerli prediktif bir parametre olduğu, rekürrens açısından ise anlamlı olmadığı kanaatini bildirmişlerdir.

Tingje ve ark.(151) yüzeysel mesane tümörlerinde rekürrens ile DNA ploidi paterninin, infiltrasyon derecesinin ve tümörün multipl olmasının yakın ilişkisi olduğunu; aneuploidinin rekürrens açısından en değerli parametre olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada rekürrens oranı aneuploid grupta diploid grubun 4 katıdır.

Norming ve Tribukait(119) ürolog için sıklıkla problem yaratan bir grup olan grade 3 yüzeysel mesane tümörlerinde (T_a ve T_1) prognostik faktörleri irdelemişlerdir. Progresyon açısından değerlendirildiğinde tümörün evresi, papiller veya non-papiller olması, multipl olması, boyutu 1 veya daha fazla aneuploidi varlığı, S fazı değeri, ve çerve mukoza biopsilerinde atipi veya TIS varlığı gibi bilinen parametrelerin hiçbirinin prognostik değeri olmadığını bulmuşlardır. FCM açısından ele alınırsa tüm grade 3 tümörler aneuploid ve hızlı proliferasyon gösteren tümörlerdir. Primer TIS olguları ve sistektomize hastalarda lenf nodu metastazı açısından değeri ispatlanmış olan multipl aneuploid hücre popülasyonu varlığı da bu çalışmada anlamsız bulunmuştur(119). Anlamlı bulunan tek parametre, hastaların takibinde, çerve mukozanın DNA incelenmesinde aneuploidinin devam etmesi veya ortaya çıkmasıdır ($p=0.001$). Çevre mukozada aneuploidinin olmaması veya takipte diploidiye dönmesi ise progresif hastalık açısından düşük riski göstermektedir. Bu çalışmanın önemli pratik mesajı, yüksek gradeli yüzeysel mesane tümörlerinde, tümöre komşu mesane mukozasının DNA içeriğinin prognostik açıdan bilinen tüm parametrelerden daha üstün olduğu, dolayısıyla, tümöre komşu mukozanın değerlendirilmesinin rutin klinik kullanıma girmesi gerekliliğidir.

Badalement ve ark(7), ploidi analizinin, hastaların tedavi planlamasında uyguladıkları protokollerini değiştirdiğini bildirmektedir. Bu grup, aneuploidi saptadıkları yüzeysel mesane tümörü olgularının tümüne intravezikal tedavi uygulamaktadır. Rekürrens olmayan (negatif sistoskopi, sitoloji ve random biopsi) olgularda dahi aneuploidi saptadıklarında

intravezikal tedavi uyguladıklarını, bunun altında yatan mantığın da standart yöntemlerden çok daha önce FCM ile rekürrensini saptanabilecek olması olduğunu savunmaktadırlar. Aynı grup, intravezikal tedavi sonrası nükslerde sistektomi kararını etkileyen faktörler arasında lamina propria invazyonu, yüksek grade ve multifokalitenin yanı sıra aneuploidi varlığının çok önemli bir bulgu olduğunu söylemektedirler. Bretton ve ark.'nın(21) çalışması da bu görüşü destekler niteliktedir. Trans uretral rezeksiyon ve intravezikal Bacillus Calmette-Guerin (BCG) uygulamasından 6 ay sonra yapılan FCM, progresyon açısından çok değerli bir prognostik faktör olarak bulunmuştur. 6. ayda FCM pozitif olan 33 hastanın 15'inde ortalama 2.5 yılda progresyon gelişmiştir, FCM negatif olan 31 hastanın ise yalnız 2'side progresyon gözlenmiştir.

İntravezikal tedavi ile DNA yapısını inceleyen birkaç çalışma daha vardır. Farsund ve ark.(54) intravezikal tedavi süresince aneuploidi-diploidi oranının anlamlı derecede azaldığını saptayarak bunun tedavinin süresini belirleyici bir faktör olabileceği görüşünü ortaya atmışlardır. Orihuela ve ark.(124) ile Saracino ve ark.(131) ayrı ayrı yaptıkları çalışmalarda aynı sonuca varmış ve diploidi gösteren tümörlerin intravezikal tedaviye daha iyi yanıt verdiğini saptamışlardır. Ancak bu çalışmalar kontrollü değildir ve diploid tümörlerde rekürrens oranının genellikle daha düşük olduğu gözönüne alındığında, bu çalışma sonucunda elde edilen daha iyi yanıtın tümörün doğal seyrine bağlı olarak mı, yoksa tedavi sonucu mu alındığına şüphe ile bakmak gerektiği düşüncesindeyiz. Bizim T1 G3 tümör nedeniyle intravezikal BCG uyguladığımız ve aneuploid patern gösteren 5 olgumuzda tedavi sonrasında diploidi saptanmıştır ve ortalama 14 aylık takipte olguların tümü hastalıksızdır. Bu konuda yorum yapabilmek için hasta sayımızın ve takip süremizin artması gerekmektedir.

FCM ile DNA yapısının değerlendirilmesinde ploidi tayini yanında bir diğer çok önemli parametre, hücrelerin proliferasyonunun bir ölçümü olan S-fazı fraksiyonudur (SPF). SPF son yıllarda ortaya atılan bir parametredir, değeri giderek daha çok anlaşılmaktadır, ancak SPF hakkında halen oturmuş kesin nümerik kriterler yoktur. Tributait ve ark.(153)

SPF değerlerini de ilk irdeleyen araştırmacılarıdır. Bu konudaki ilk yayınlarında diploid tümörlerde SPF değerini % 6.4, aneuploid tümörlerde ise % 17 ($p < 0.001$) bulmuşlardır. Histolojik grade ve proliferasyon derecesi arasında iyi korelasyon saptamışlar, grade 3 tümörlerde aneuploidiye yüksek SPF değerinin eşlik ettiğini ve bunun grade 2 olgularla karşılaştırılmasının istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bildirmişlerdir. Grade 2 tümörler içinde ise aneuploid ve diploid olgular arasında proliferasyon açısından fark yoktur. Yazarların grade 2 tümörleri 2a ve 2b olarak sınıfladılarına daha önce değinilmişti; ilginç olarak grade 2a ve 2b arasında SPF değerleri arasındaki fark anlamlı bulunmuştur: % 4.3 ve % 8.9, ($p < 0.001$). Bu çalışmada ploidi ile proliferasyon derecesi arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Aynı grup(154), 100 olguluk daha geniş kapsamlı bir çalışmada, ploidi ile proliferasyon derecesinin ilişkili olduklarını ortaya koymayı başarmışlardır. Aneuploid tümörlerde SPF değerinin diploid tümörlerden yüksek olduğunu göstermenin yanısıra triploidinin tetraploidiye oranla daha yüksek proliferasyon derecesiyle birlikte olduğunu da ortaya çıkartmışlardır. Aynı çalışmada, tümörün invazyon derecesi, yani evresinin artması ile SPF değerinin de arttığı görülmüştür. T₁, T₂, T₃ ve TIS'de S-fazı değerleri sırasıyla % 11, % 16, % 21.8 ve % 15'dir. Bu çalışmada kontrol grubunun SPF değeri % 5.0±1.6'dır.

Tachibana ve ark.(148) yüksek gradeli değişici epitel hücreli karşinomada aneuploid DNA ve yüksek SPF değeri, düşük gradeli tümörde ise diploidi ve düşük SPF değerinin olguların çoğunluğunda görüldüğünü saptamışlardır. Grade 2 tümörlerin ise diploid DNA ve düşük SPF ve aneuploid DNA ve yüksek SPF olarak sınıflanabileceğini ne sürmüşlerdir. Bu mesele tümörlerinin malignite potansiyellerinin matematiksel ve kantitatif bir sınıflamasıdır. Ayrıca bu çalışmadaki invaziv tümörlerde aneuploidi ve yüksek SPF değeri, non-invaziv tümörlerde ise ploidiye bağımlı olmaksızın düşük SPF değerleri saptanmıştır. Bundan yola çıkarak yazarlar, DNA aneuploid tümörlerin yüksek veya düşük SPF değerine göre sınıflanabileceği ve bunun tümörün invaziv potansiyeli hakkında bilgi verdiğini savunmakta-

dırlar.

Masters ve ark.(105) evre T₁ tümörlerde prognostik faktörleri irdeledikleri çalışmalarında SPF değeri ve klinik seyir arasında korelasyon bildirmektedirler. Yazarlar SPF değerlerini üç grupta incelemişler; düşük (% 0-7), orta (% 7-14) ve yüksek (% >14). Düşük ve orta dereceli SPF değeri olan olgularda progresyon oranı % 7, yüksek SPF'de ise % 35'dir. Progresyon açısından grade 3, aneuploidi ve yüksek SPF'nin sensitiviteleeri sırasıyla % 60, % 89 ve % 78, tümümün prediktif değerleri ise % 35 olarak bildirilmiştir.

DeVita ve ark.(189) SPF açısından değerlendirdiklerinde, normal mukoza (3.7±1.8) diploid tümörler (8.4±3.9) ve aneuploid tümörler (14.9±6.0) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulmuşlardır (p<0.01). SPF oranının yalnız aneuploid grupta grade ile birlikte arttığı saptanmıştır. Yazarların çalışma sonucunda vardıkları hipoteze göre agresif tümörler aneuploiddir, bunların arasında en agresif olanları da en proliferatif olanlarıdır.

Tribukait ve ark.(155) yine bir çalışmada SPF'nin sağkalım ile yakın ilişkisi olduğunu ve bunun ploidaden bağımsız olmadığını çünkü ploidi ile SPF arasında da kuvvetli korelasyon varlığını saptamışlardır. Bu çalışmada diploidi gösteren mesane tümörü olgularından yalnız birinde SPF % 10'un üzerindedir, aneuploid tümörlerin çoğunda (% 77) ise SPF % 10'dan büyüktür. Aneuploidisi ve > % 10 SPF değeri olan hastaların % 62'si 4 yıllık takipte hastalıkları nedeniyle ölmüştür, bu oran SPF'nin < % 10 olduğu hastalarda ise % 5'dir.

Çalışmamızda sentez fazını ölçerek tümör proliferasyonu hakkında bilgi veren SPF değerinin flowsitometrik DNA analizinde çok önemli bir parametre olduğu sonucuna varılmıştır. SPF ile hem grade ve hem evre arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır. Tümörün histomorfolojik diferansiyasyon derecesi bozuldukça, yeni grade'i arttıkça, SPF değeri de yükselmektedir ve bu artış istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulunmuş-

tur ($p=0,003$). Kontrol grubunda % 6.8 olan SPF değeri, grade 1, 2 ve 3 için sırasıyla %16.9, %21.7 ve %25.6'dır. Evre açısından değerlendirildiğinde de, tümörün artan invazyon derecesi ile paralel olarak SPF değerinin arttığı ve bunun da istatistiki açıdan ileri derecede anlamlı olduğu görüldü ($p=0.0001$). Ta, T₁, Ta+T₁ (yüzeyel tümörler), TIS ve T₂₋₃ için SPF değerleri sırasıyla % 18.4, % 25.1, % 21.0, % 22.9 ve % 28.4'dür.

SPF ile ploidi ilişkisine bakıldığında diploid tümörlerde ortalama SPF % 16.8, aneuploid tümörlerde ise % 27.3 olarak bulunmuştur ve fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.002$). Yüzeyel tümörlerde (Ta-T₁) diploid ve aneuploid grupta SPF değerleri % 17.1 ve % 25.6 ($p<0.009$), grade 2 tümörlerde ise % 17 ve % 26.6 ($p=0,02$) bulunmuştur.

Progresyon saptanan 7 yüzeyel tümörlü hastamızın tümünde aneuploidi saptanmıştır, bu olgularda ortalama SPF değeri 32.2 ± 7.3 'dür. 7 olgudan oluşan bir grup ile yorum yapmak anlamlı değildir ancak yukarıda özetlenen literatür bilgisi ile birleştirildiğinde SPF'nin ploidi ile ilişkili ancak belki de ploiden daha duyarlı bir prognostik faktör olduğu kanaati oluşmaktadır. DeVita ve ark.'nın(189) hipotezini bir kere daha hatırlarsak, agresif tümörler aneuploiddir; bunların arasında en agresif olanları da en proliferatif olanlarıdır.

Dikkat edilecek olursa düşük gradeli veya mukozaya sınırlı ve diploid olguların SPF değerleri birbirlerine çok yakın ve % 20'nin altındadır; sırasıyla bu değerler % 16.9, % 13.4, % 17.1, % 17 olarak saptanmıştır Grade I'de % 16.9 olan SPF değeri, grade 2'de % 21.7'e, grade 3'de %25.6'ya ulaşmaktadır. Ta'da % 18.4 iken T₁'de % 25.1'dir; grade 2 diploid grupta % 17 iken, aneuploid grupta % 26.6'dır ($p=0.009$); bununla büyük paralellik içinde olduğu dikkatimizi çeken yüzeyel tümörlerin dağılımında da diploidlerde % 17.1, aneuploidlerde % 25.6'dır. Tüm kanserli hastalar ele alındığında diploid tümörlerde ortalama SPF değeri % 16.8, aneuploid tümörlerde ise % 27.3 olarak saptanmıştır. Bütün bu bulgular birbirleriyle çok uyumludur ve kanımızca bize çok değerli bilgiler vermektedirler. Halen SPF'nin nümerik kriterlerini kesin olarak tanımlayabilen

bir literatür yoktur. Kontrol grubumuzun ortalama SPF değeri 6.8 ± 2.2 'dir. Literatür ile karşılaştırıldığında bu değer hafifçe yüksektir ancak bunun nedeni kontrol grubundaki olguların hiçbirinin tamamen sağlıklı olmaması, non-tümöral hastalıkları olması, dolayısıyla ürotelyal hücre yapım/yıkımının kısmen hızlanmış olmasıdır. Kanımızca % 20'nin altındaki değerler daha selim tabiatlı bir tümörü, % 20-25 arası değerler orta derecede agresif davranışı, > % 25 değerler ise mesane tümöründe agresif davranışı temsil etmektedir. Progresyon görülen olguların ortalama SPF değerinin % 32.2 olması bu kanaatimizi destekler niteliktedir.

İnsanda mesane tümörünün proliferasyon derecesi ile ilgili yapılmış çalışmalar çok azdır. Bunlardan birinde Stathmokinetik teknik uygulanmış, colcemid uygulanması sonrası mitotik indeks hesaplanmış ve tümörlerin potansiyel proliferasyon hızları hesaplanmıştır(58). Tümörün sayısal olarak iki kat artması için gereken süre indifferansiyel tümörlerde 2 gün, az diferansiyel tümörlerde 6 gün, iyi diferansiyel tümörlerde ise 22 gün bulunmuştur. Dolayısıyla tümörün diferansiyasyonu ile çoğalma hızı arasında kesin bir korelasyon vardır ve SPF değeri de kanımızca bunu yansıtmaktadır. SPF değerleri < % 10, % 10-20 arası ve > % 20 olarak 3 gruba ayrılarak rekürrens indeksi açısından irdelendi. Bu üç grubun RI'leri sırasıyla 14.4, 14.8 ve 26.1 olarak bulundu. % 20 altı ve üstü değerlerin RI'leri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,02$). Bu bulgu da %20'nin üzerindeki SPF değerinin tümörün biyolojik agresivitesini arttırdığını doğrulamaktadır.

Bir hücre popülasyonundaki DNA içeriğini gösteren diğer bir gösterge de DNA indeksidir (DI). DNA indeksi histogramda elde edilen pikleri, tümörün kaynaklandığı normal dokudan elde edilen kontrol ölçümlerindeki diploid piklere göre ifade eden bir formüldür. DI'e göre hücredeki DNA içeriğinin adlandırılması Tablo 3'de verilmiştir. Diploidide DI 1.0'dir, bu normal somatik hücredeki kromozom sayısını gösterir ve insan için 46 kromozomdur; türe özgün kromozom sayısından sapma olduğunda aneuploididen bahsedilir, aneuploidide DI 1.0'den küçük veya büyüktür. 1.0'den küçük olduğunda hipodiploidi, büyük olduğunda ise hiperdiploidi-

den bahsedilir. Tetraploidide DI 2.0'dir ve kromozom sayısı 92'dir. Histogramda DI 1.0-1.2 arasında bir pike near-diploidi denir.

Devonec(47) mesane tümörlerinde progresyonda 3 etaplı teoriyi ortaya atmıştır. Birinci etapta hücrenin DNA içeriğinde minimal değişiklik meydana gelir (diploid veya near-diploid hücreler); ikinci etapta hücrede kromozomal duplikasyon olur, ancak hücre bölünmesi gerçekleşmez ve tetraploidi oluşur; üçüncü ve son etapta hücrede bir miktar DNA kaybı olur ve hücre aneuploid olur. Yazara göre bu nedenle yüzeysel mesane tümörlerinde 1.4 ile 1.6 arasında DI değeri çok nadiren saptanmaktadır.

Tetraploidi aneuploidinin bir formu olmasına rağmen genellikle tetraploid aneuploid tümörlerde prognoz non-tetraploid aneuploidlerden daha iyi olduğu kabul edilmektedir. Wijskström ve ark(172) tetraploid DNA içeriğinin genomik yapısının daha stabil olduğunu, aneuploid tümörlerin tetraploididen saptıkça malignite ve invazyon derecelerinin arttığını, 64 kromozom içeren, yani triploid olan tümörlerin ise derin invazyon gösterdiğini savunmaktadırlar.

Oljansa ve Tanke(122) DI 1.5'dan küçük olan tümörlerde, rekürrens oranının DI'i 1.5'den büyük olanlardan daha düşük olduğunu ileri sürmüştür; ancak Tribukait ve ark.(155) böyle bir ploidi derecesine göre tümörlerin prognostik olarak sınıflandırılması görüşüne katılmamaktadır.

Bizim çalışma grubumuzdaki olgularda, hem Ta tümörlerde hem grade 1 tümörlerde ortalama DI'nin 1.2 bulunması (near-diploid) tutarlı, ilginç ve dikkat çekicidir. Literatürde (DI'i 1.2) (near-diploid) tümörlerle ilgili anlamlı sonuç alınmış yayın olmadığı gibi, DI'i 1.2 olan böyle geniş verili bir yayın da yoktur. Evre T₁ ve TIS'de DI 1.8, T₂₋₃'de ise 1.7'dir. Görüldüğü gibi T₁ ve TIS değerleri tetraploidiye daha yakinken, invaziv tümörlerde DI triploidiye daha yakındır. Bu bulgular Devonec'in hipotezi ile uyumludur.

İstatistiksel değerlendirme için near-diploid tümörler diploid, tetraploid tümörler ise aneuploid tümörlerle birlikte değerlendirilmiştir. Görüldüğü gibi FCM klinik açıdan daha çok yüzeysel tümörlerin ve grade 2 tümörlerin değerlendirilmesinde yardımcıdır. Acaba invaziv mesane tümöründe FCM klinisyene yardımcı olabilir mi? Tüm invaziv tümörlerde aneuploidi ve yüksek SPF değeri saptanmakta mı? Chin ve ark(27), T₃₋₄ tümörlerinde % 25 diploidi, metastatik odaktan yapılan 6 biyopsinin ikisinde de diploidi saptamışlardır. Bazı sitogenetik araştırmalar büyük kromozomal anomalilerin eşlik etmediği invaziv tümörlerin varlığını göstermiştir. Örneğin Wijkström ve ark(172) 45-48 kromozom sayısı olan yüksek gradeli invaziv tümörlerin varlığını ortaya koymuştur, bunlar FCM açıdan diploid tümörlerdir, çünkü FCM bir-iki kromozomluk varyasyonları saptayamaz.

Tümörün metastatik potansiyeli lenfatik veya venöz invazyonu ile değerlendirilmektedir. Hamano ve ark.(63) lenfatik ve venöz invazyon gösteren tümörlerde ploidi yapısının genellikle aneuploid olduğunu bildirmektedirler. Badelement ve Tribukait(154) da aynı görüştedirler. Shaabon ve Tribukait(134) invaziv mesane tümörü nedeniyle sistektomi uyguladıkları 162 hastalık serilerinde diploid tümörlerde % 6 oranında lenf nodu metastazı saptarken, aneuploid tümörlerde bu oranı % 34 olarak bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada yüksek SPF değerlerinin lenfatik metastaz olasılığını arttırdığı gösterilmiştir.

Badalement ve ark(7) invaziv mesane kanseri tedavisinde sistematik kemoterapi veya radyoterapi sonrası FCM'nin çok değerli bilgi verdiğini, bu tedavilerden sonra hastalığın evresinde gerileme olduğu taktirde bazı hekimlerin hastayı intravezikal kemoterapi ile tedavi ettiğini, ancak tedavi sonrası tümörün DNA yapısı değişmez ise bunun sistektomi endikasyonu olması gerektiği fikrini savunmaktadırlar.

Hug ve ark.nın(77) bulguları ise çok farklıdır. İnvaziv mesane tümörü olan 40 hastaya uyguladıkları mesane koruyucu tedavi protokolü transüretal rezeksiyon + neoadjuvant kemoterapi + 40gy radyoterapi + cisplatin'dir. Bundan sonra hastalar yeniden değerlendirilmiştir. Tümörle-

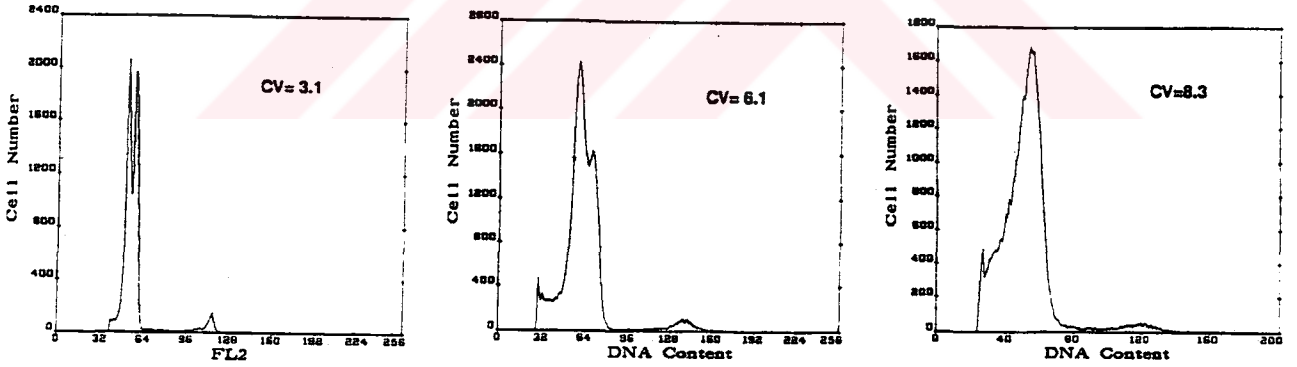
rin % 59'unda saf aneuploidi, % 27'sinde saf diploidi, 5 olguda da farklı biopsilerde diploidi ve aneuploidi saptanmıştır (kısmen diploid). Olguların 30 aylık ortalama takibinde sağkalım oranı aneuploid grupta % 82 iken diploid grupta % 47'dir. İstatistiksel açıdan saf aneuploidi ile invaziv hastalıktan kurtulma arasında anlamlı ilişki bulunmuştur ($p=0.05$). Diploid grupta hem sağkalım süresi daha kısa, hem de tedaviye alınan yanıt aneuploid gruba göre çok daha düşük olarak bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonucuna göre invaziv mesane tümörlerinde aneuploidi kemoterapi ve radyoterapiye daha iyi yanıt alınacağına bir belirleyicisidir, bu da daha hızlı proliferasyona bağlı olabilir.

Diğer taraftan tedavi şeklinin yalnızca cerrahi olduğu Mainz grubu, en uzun sağkalım oranının saf diploid tümörlerde olduğunu bildirmektedir.

Wijkström ve ark(180) mesane kanserinin radikal radyoterapiye yanıtında FCM'nin değerini irdeledikleri çalışmada, tümörün ploidi ile radyasyon duyarlılığının ilişkili olduğunu, diploid ve aneuploid tümör grupları karşılaştırıldığında bunun çok çarpıcı olduğunu bildirmektedirler. Radyoterapi sonrası tüm diploid tümörler kaybolmuş, tek bir aneuploid pik bulunan olgularda tümör % 55 oranında ortadan kalkmış, birden fazla aneuploid pik olan olgularda ise % 30 oranında kaybolmuştur.

Görüldüğü gibi invaziv mesane kanserinde FCM'nin rolü ile ilgili çok çelişkili yayınlar mevcuttur ve bu konuda prospektif ve randomize çalışmalara ihtiyaç vardır. Günümüzde invaziv tümörde transüretal rezeksiyon, neo-adjuvan kemoterapi, parsiyel sistektomi, radyoterapi ve radikal sistektomi gibi geniş bir tedavi seçeneği yelpazesi vardır ve pekçok merkezde bu tedavi seçenekleri çeşitli şekillerde kombine edilmektedir. Tüm çalışmaların ortak amacı hastayı tümöründen arındırmak ve mümkün olduğu kadar mesaneyi korumaktır. Doğru tedavi kararının alınmasında flow sitometrik DNA analizinin invaziv tümör grubunda da yardımcı bir yöntem olarak pek yakında rutin kullanıma gireceği düşüncesindeyiz.

Flow sitometrinin sonucunu etkileyebilecek bazı teknik özellikler olabilir(135). Kullanılan DNA boyası, boya: DNA oranı, hücrenin kromatin durumu ve kullanılan cihaz sonuçları etkileyebilir. Optimum boyama ve enstrumantasyon şartlarında dahi FCM ancak bir veya iki büyük kromozomun etkilenmesini veya kaybolmasını saptayabilmektedir. Ayrıca her boya her kromozomu boyamamaktadır, dolayısıyla bir kromozom kaybı veya ilavesi belirli bir boya ile gösterilebilirken, diğer boylarla gösterilemez. Bazı tümörlerde dengeli translokasyonlar oluşur, bu sitogenetik açıdan genomu değiştirir ancak hücrelerin DNA içeriği değişmez, yani hücreler diploiddir; yalnız DNA içeriği ölçümü yaparak FCM ile bu değişimi saptayabilmek imkansızdır. Materyal ve metod bölümünde histogramların analizi ve ölçümlerin kalitesinin kontrolü için önerilen varyasyon katsayısı (coefficient of variation - CV) değerinden bahsedilmiştir. Geniş CV değerleri near-diploid aneuploid hücre popülasyonunun tanınmasını zorlaştırmaktadır.



Şekil 5

Şekil 5'de görüldüğü gibi CV değeri arttıkça near-diploid pikin seçilmesi güçleşmektedir. Ortadaki şekilde % 6 CV değerindeki histogramda görülen birinci pikteki omuz genellikle aneuploid olarak yorumlanır. Kromatin yoğunluğunun farklı olduğu durumlarda veya diğer hücreleri yutmuş makrofajların varlığında, saf DNA diploid hücrelerde de böyle omuz görülebilmektedir. DNA aneuploid bir popülasyon varlığının önemi düşü-

nüldüğünde, bu gibi durumlarda konservatif davranmak uygun olur. Böyle bir olguda tetkik yeni bir örnek ve farklı bir boya ile tekrarlanmalıdır. Genellikle kural olarak % 7 ve üzeri CV değerleri ile $DI \leq 1.2$ olan tümörleri yakalamak olanaksızdır. Yüksek CV değerinin bir diğer olumsuz etkisi S fazının nerede başlayıp nerede bittiğinin belirlenmesini güçleştirmesidir. % 7'nin üzerindeki CV değerleri ile SPF değerlendirmesinde hata oranı % 50'ye kadar yükselebilmektedir. Çalışmamızda ortalama CV değeri 5.8'dir ve CV değeri ≥ 10 olan olgular çalışma kapsamına alınmamıştır.

FCM'nin önemli bir dezavantajı pahalı bir tetkik olması, pahalı tetkik donanım ve bu konuda yetişmiş eleman ihtiyacıdır. Konuya olan talep arttıkça bu problemlerin de azalacağı; konuyla ilgili birkaç merkezde yürütülecek analizlerde hasta başına düşen maddi yükün azalacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızın ikinci bölümünü FCM ile konvansiyonel sitolojinin karşılaştırması oluşturmaktadır. Bilindiği gibi mesane tümörlerinin takibinde kullanılan klasik yöntemler sistoskopi ve sitolojidir. Endoskopide bazı tümörler lokalizasyonları nedeniyle gözden kaçabilir, ayrıca henüz makroskopik olarak gözle görünmeyen intraürotelyal malign gelişmeler olabilir; bu gibi durumlarda sitoloji vazgeçilmez yardımcı bir yöntemdir. Bilindiği gibi flowsitometri (FCM) yüksek hızlı bilgisayarların yaşama geçirilmesi sayesinde geliştirilen kantitatif bir sitoloji yöntemidir. Shapiro(137) iki yöntemin benzerliklerin vurgulamıştır. Mikroskopta incelenecek materyal kesilir, boyanır ve hücreler tek tek görülebilir hale getirilir, örnek aydınlatılır, gönderilen ve dağılan ışık bir seri lens yardımıyla toplanır (mikroskopun objektivi ve gözlemcinin gözü), imaj retinaya yansır ve buradan beyine elektriksel bir sinyal gider. FCM örneği tek bir hücre veya hücreyi oluşturan partiküllerden oluşan bir süspansiyondur; örnek florens veren bir boya ile boyandıktan sonra bir lazer ışık kaynağı önünden tek tek hücreler şeklinde geçirilir. Gönderilen ve dağılan ışık bir prizma tarafından odaklanır, fotodetektörlerce toplanır ve oluşturulan elektrik sinyalleri bir bilgisayara iletilir.

Prensipite aynı olan bu iki sistemin, pratikte birçok farklılığı vardır. FCM ile hücrenin hem fiziksel hem biyolojik birçok özelliğini öğrenmek ve tek hücre seviyesinde, kantitatif hücre analizi yapabilmek mümkündür. DNA içeriği, RNA içeriği veya enzim aktivitesi gibi bazı hücresel parametreleri hızlı ve duyarlı olarak ölçebilmenin yanısıra örnek içinde aranan hücre popülasyonunu yüzey antijenleri yardımıyla kantitatif olarak saptamak da mümkündür. Bu verilerin morfolojik tanıyı doğrulamakla birlikte diyagnostik ve prognostik değerleri de vardır. Ayrıca konvansiyonel sitopatolojik metodlar ile yapılabilenin çok ötesinde bir hızla, çok büyük sayıda hücre analizi yapılabilmektedir, bu büyük hücre grubu içindeki çok az sayıda tümör subpopülasyonu saptanabilir. Yani FCM, konvansiyonel sitolojiye göre çok daha kısa sürede çok daha fazla hücre sayımına olanak veren, objektif, kolay tekrarlanabilen ve multiparametrik bir yöntemdir(128).

Çalışmamızda mesane tümörlü olguların takibinde FCM'nin sensitivitesi araştırılmış ve konvansiyonel sitoloji ile karşılaştırılmıştır. Her iki değerlendirme de aynı yıkantı sıvısında çalışılmış ve olgulardan aynı seansta biopsiler alınarak sonuçlar karşılaştırılmıştır.

1945 yılında Papanicolaou'nun idrar sitolojisi ile ilgili ilk yayınından sonra, bu tekniğin duyarlılığı (sensitivite) pekçok çalışmaya konu olmuştur. Sonuçlar arasında farklılığa yol açan bazı etkenler numunenin toplanma tekniği, tümör grade ve evresi, ve pozitif yorumun tanımıdır. Mesane tümöründe sitolojinin duyarlılığını Umiker % 26 - % 100 (% 72), Lewis % 41 - % 100 (% 70), Beyer-Boon % 66 ve Soloway grade 1,2, ve 3 için % 10, % 50 ve % 90 olarak bildirmiştir.

Badalement ve ark.(8) 70 olguluk bir çalışmada idrar sitolojisi (VUC), mesane yıkantı sıvısı sitolojisi (BWC) ve mesane yıkantı sıvısı flow sitometrisini (BwFCM) karşılaştırmışlardır. Tüm tümör kategorileri için VUC'nin sensitivitesi 1, 2, ve 3 analiz için % 41, % 41 ve % 60'dır. Tek bir BWC'nin duyarlılığı % 61, tek bir BwFCM'nin ise % 83'dür. Yani tek bir BwFCM hem üç VUC, hem de bir BWC'den daha duyarlı, bir BWC'de iki VUC'den daha duyarlıdır. Yazarlar FCM ile alınan sonucun üstünlüğünü;

hem yıkantı sıvısının idrar örneğine göre üstün olmasına, hem de tekniğin üstünlüğüne bağlamaktadırlar. Bu çalışma irrigasyon sıvısının idrara oranla daha fazla hücre örneği alımına, daha iyi hücre korunmasına, mesane epitelinin daha iyi temsil edilmesine ve daha az debri ile çalışmaya olanak verdiğini göstermiştir. Bu çalışmanın yanlış negatiflik oranı % 17'dir. Her üç yöntem kombine edildiğinde duyarlılık % 89'a ulaşmıştır.

Aynı grubun benzeri bir diğer yayınında BWC'nin 1,2,3 ve 4 muayene ile duyarlılığı % 49, % 54, % 62 ve % 66, BWFCM ile ise % 78 olduğu bildirilmiştir.

Romere ve ark.(129) BWC ve BWFCM'nin grade 2 ve 3 mesane tümörlerinde duyarlı olduklarını, grade 1 tümörlerde her iki yöntemin de duyarsız olduğunu ve FCM'nin diagnostik açıdan konvansiyonel sitolojiye bir üstünlüğü olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada yanlış pozitiflik oranı FCM için % 5, sitoloji için % 14'dür.

Klein ve ark.(89) mesane yıkantı sıvısında FCM'nin yanlış pozitiflik oranını araştırmışlar ve 100 normal veya non-tümöral hastalığı olan bir olgu grubunda bu oranı % 2 bulmuşlardır.

Giela ve ark.(183) yaptıkları retrospektif bir çalışmada, sensitivite ve spesifisite değerlerini FCM için % 76 ve % 36, idrar sitolojisi için ise % 40 ve % 81 olarak vermişlerdir, yani FCM'nin sensitivitesi sitolojiden daha yüksek, ancak spesifitesi daha düşüktür. Yazarların özellikle üzerinde durdukları bir konu alınan yanlış pozitif sonuçlardır. Yüzeysel mesane tümörü olan olguların 5 yıllık takibinde yanlış pozitif FCM veya sitoloji sonucu alınmayan yalnız 4 hasta vardır ve bu 4 olgunun takibinde rekürrens saptanmamıştır. Ancak bu çalışmanın en ilginç bulgusu yanlış pozitif FCM ve sitoloji sonucu alınan, yani sistoskopi ve biopside tümör saptanmayan ancak FCM ve sitoloji bulguları ile malignite saptanan yüzeysel tümürlü olguların 5 yıllık takip sonuçlarıdır. Uzun süreli takipte bu hastalarda çok önemli oranda tümör rekürrensi görülmüştür. Bu oran FCM için % 87, sitoloji için % 84'dür. Yazarların bu bulgudan hareketle vardıkları

çok önemli yorum bu testlerin, yani sitoloji ve FCM'nin, sistoskopiden çok daha önce tümör rekürrenslerini saptadığıdır.

Diğer taraftan yanlış pozitif sonuç alınabilecek bir hasta grubu daha vardır. FCM anormal DNA içeren urotelyal hücreleri saptamada ileri derecede duyarlı bir yöntemdir, dolayısıyla, bu hücreler reaktif/regeneratif veya neoplastik olabilirler. Anormal DNA ploidi kanserle eş anlamlı değildir, bu nedenle ürotelyal hücre yapım ve yıkımının hızlandığı üriner sistem taşı, şiddetli üriner enfeksiyon ve hatta infravezikal obstrüksiyon gibi patolojilerde alınan örneklerin birkaçında pozitif histogram elde edilebilmektedir. Murphy ve Soloway(115) bu tip yanlış pozitif FCM olgularının hiçbirinde pozitif sitoloji saptamamışlar, tümör anamnezi olmayan bu olgularda klinik olarak fazla endişe duyulmaması gerektiğini vurgulamışlardır.

Bize göre yüzeysel mesane tümörlü olguların takibinde, selim olgularda yanlış pozitiflik nedeniyle hastanın gereksiz muayene edilmesi elbette ideal şartlarda arzu edilmeyen bir durumdur; ancak çok daha önemli olan ,tümörü olan olguları atlamamaktır. Bu nedenle yapılan çalışmalarda, malignite kriterlerinin sensitiviteyi arttırıcı nitelikte olması gereklidir.

Günümüzde pekçok araştırmacının FCM için malignite kriteri(1) bir veya birden fazla aneuploid pik varlığı ve/veya (2) G_2+M fazındaki hücrelerin % 15 ve üzerinde olmasıdır. % 10-15 arası değerler ise şüpheli olarak değerlendirilir. Kanaatimizce artık SPF değerinin de bir malignite kriteri olarak yerini alması gereklidir. Çalışmamızda sonuçlar değerlendirilirken % 10'un üzerindeki SPF değeri de üçüncü bir malignite kriteri olarak alınmıştır.

Çalışmada sitolojinin sensitivitesi % 60, spesifitesi % 93 olarak bulundu. SPF değeri malignite kriteri olarak alınmadığında FCM'nin sensitivite ve spesifitesi sırasıyla % 79 ve % 93, SPF değeri malignite kriteri kabul edildiğinde ise % 89 ve % 80'dir.

Görüldüğü gibi her iki durumda da FCM sensitivite açısından

sitolojiden daha üstündür. Yukarıda söz edildiği gibi yöntemin sensitivitesinin yüksek olması, pratik açıdan arzulan bir durumdur. Bu sebeple SPF değerinin de bir parametre olması gerektiği kanısındayız. Bu durumda FCM'nin spesifitesi sitolojiden daha düşüktür. FCM ve sitoloji kombine edildiğinde sensitivite % 96'ya ulaşmaktadır ve bu Murphy'nin % 95 değeri ile aynıdır.

Yanlış negatiflik oranımız sitoloji için % 40, FCM için % 9'dur. FCM'nin negatif olduğu 3 olguda sitoloji pozitif bulunmuştur. Tümörü olan ve hem FCM hem sitolojisi (-) olan 2 olgu TaG₁ tümörlü olgulardır.

Yanlış pozitiflik oranı sitoloji için % 7, FCM için % 29 bulunmuştur. Yanlış pozitiflik saptanan ve daha önce tümörü olan 2 olguda 6. ayda ve 1 olguda 12. ayda tümör saptanmıştır.

Görüldüğü gibi mesane tümörlü olguların takibinde FCM ve sitoloji birbirlerini tamamlayan iki yardımcı yöntemdir. İki yöntemin kombinasyonu ile tümörü olan olguların % 96'sına tanı konabilmektedir. Buradan şöyle bir sonuca varmak mümkündür. Kanaatimizce düşük riskli yüzeysel mesane tümörü hastalarında sitoloji + FCM kombinasyonu tek başın bir takip yöntemi olabilir. Böylece bu hastalarda sistoskopi sıklığı azaltılarak, hastaya yüklenen morbidite ve maddi yük azaltılmış olur. Ayrıca mesane yıkantı sıvısı sistoskopi ile görülenden daha zengin hücre örneği içermekte olup DNA ploidi anomalisi henüz histolojik olarak normal görülen urotelyum değişikliklerini yansıtabilmektedir. Burada arzulanmayan yanlış negatiflik oranı, yani var olan tümörün saptanamamasıdır. Bunun önlenmesi için sitokeratin, DNA/RNA oranı veya monoklonal antikörlerin tayini gibi parametrelerin, DNA içeriğine eklenmesi gerekir. Çeşitli merkezlerde yürütülen araştırmalar değişici epitel hücreli karsinom hücrelerinde mevcut olan, ancak normal genitoüriner hücrelerde olmayan bazı markerları ortaya çıkartmaktadır. Tümör spesifik hücre yüzey antijenlerine karşı monoklonal antikör umut vaatmektedir. Ancak bu markerların sensitivite ve spesifisiteleri henüz tam olarak ortaya konamamıştır. Bazı spesifik sitokeratinler, çok parametrelili flow sitometri teknikleri için çok yararlı

gözükmektedir. Bu markerları parafin kesitlerde çalışmak teknik olarak olanaksız olduğu için, gerçek değerlerini bundan sonra yapılacak prospektif çalışmalar ortaya çıkaracaktır.

"Flow sitometride yakın geçmişte kaydedilen gelişmenin hızı ileriye yönelik umutlarımızı arttırmaktadır; FCM çok yakın bir gelecekte hastanın tümörünün "parmak izi" kadar özel bilgi edinmemizi sağlayıp, tedavinin yönlendirilmesinde temel teşkil edebilecektir"(13).



SONUÇ

Mesane tümörlü olgularda, tümör hücre DNA'sının flowsitometrik yöntemle yapılan analizinde;

- 1- DNA ploidi ile tümörün hem grade ve hem evresi arasında anlamlı ilişki olduğu görülmüştür. Düşük grade ve evrede diploidi hakimken, yüksek grade ve evrede aneuploidi hakim olmaktadır.
- 2- Grade 1 ve mukozaya sınırlı (Ta) tümörlerde ortalama DNA indeksi (DI) 1.2 bulunmuştur; yani bu grupta hakim olan histogram paterni near-diploiddir. Bu bulgu, literatürde teorik olarak olması gerektiği bildirilmekle beraber, henüz bugüne kadar yapılmış bir çalışma ile ispatlanmamıştır.
- 3- Tümörün proliferasyon derecesi hakkında bilgi veren S-fazı fraksiyonunun (SPF), ploidin yanısıra çok önemli bir parametre olduğu görülmüştür. Tıpkı ploide olduğu gibi, SPF ile tümörün hem grade ve hem evresi arasında anlamlı ilişki olduğu saptanmıştır. SPF değerinin % 10-20 arasında olmasının tümörün biyolojik davranışının daha selim olacağını, % 20 üzerindeki SPF değerinin ise agresif davranışı gösterdiği saptanmıştır.
- 4- FCM ile DNA analizinin iki önemli parametresi olan ploidi ve SPF'nin kendi aralarında da korelasyon gösterdikleri ispatlanmıştır.

- 5- Aynı histomorfolojik diferansiasyon derecesini gösteren ancak DNA içeriği açısından heterojen bir yapıya sahip olan grade 2 tümörlerin, FCM ile diploid + düşük SPF değerli (düşük riskli) ve aneuploid + yüksek SPF değerli (yüksek riskli) iki ayrı grupta incelenebileceği gösterilmiştir. Aynı parametrelerin yüzeysel tümörlere (Ta-T₁)'de uygulanmasının anlamlı ve klinik açıdan yararlı olduğu ispatlanmıştır.
- 6- Yüzeysel mesane tümörlerinde rekürrens açısından evre ve grade'in prognostik değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken, FCM ile hem DNA ploidisinin, hem SPF değerinin prognostik değerleri anlamlı bulunmuştur. Aneuploidinin ve yüksek SPF değerinin (> % 20), rekürrens oranını arttırdığı görülmüştür.
- 7- Progresyon görülen 7 olgunun hepsinde ploidi yapısı aneuploid ve SPF değeri % 20'nin üzerindedir (ortalama % 32.2).
- 8- Mesane tümörü tanısı konmasında ve yüzeysel mesane tümörlerinin takibinde FCM'nin sensitivitesi, konvansiyonel sitolojiye göre daha fazla, spesifitesi ise daha düşük bulunmuştur. FCM için sensitivite % 89, spesifite % 80, aynı değerler sitoloji için sırasıyla % 60 ve % 93'dür. Her iki yöntemin kombine edilmesi ile sensitivite % 96'ya ulaşmaktadır.
- 9- FCM'nin değerlendirilmesinde SPF değerinin bir parametre olarak kabul edilmesi gerektiği (> % 20) ve bunun yöntemin sensitivitesini arttırdığı gösterilmiştir. Bu bilgi de daha önce literatürde bildirilmemiştir.
- 10- Çalışmada yanlış negatiflik oranı FCM için % 9, sitoloji için % 40, yanlış pozitiflik oranı ise FCM için % 29, sitoloji için % 7'dir.
- 11- Düşük risk grubuna dahil edilen yüzeysel mesane tümörlü olguların takibinde sistoskopi sayısının azaltılarak hastaların FCM + sitoloji ile takip edilebileceği kanaatine varılmıştır.

K A Y N A K L A R

- 1- Althausen,A.F., Prout,GR Jr., Dally J.J.: Non-invazive papillary carcinoma of the bladder associated with carcinoma in situ. J.Urol., 1160:575, 1976.
- 2- American Cancer Society. Cancer statistics. Cancer, 39:3, 1989.
- 3- Anderstrom,C., Johansson,C., Nilsson,S: The significance of lamina propria invasion on the prognosis of patients with bladder tumors. J. Urol., 124:23, 1980.
- 4- Atkin,N.B., and Fox,M.F.: 5q deletion: The sole chromosome change in a carcinoma of the bladder. Cancer Genet. Cytogenet, 46:129, 1980.
- 5- Axtell,L.M., Asire,A., Myers,M.H.: Cancer patient survival. report no 5. DHEW publication no 77-992, 1976.
- 6- Babu,V.R., Miles,B.J., Cerney,J.C., et al: Chromosome 21q-22 deletion: A specific chromosome change in a new bladder cancer subgroup. Cancer Genet. Cytogenet., 38:127, 1989.
- 7- Badalement,R.A., Ortolano,V., Burgers,J.K.: Indications for adjuvant intravesical therapy. In: The urologic clinics of North America. Edited by Lamm,D.L., Philadelphia: Hareourt Brace Jovanovich, Inc., pp 485-498, 1992.
- 8- Badalement,R.A., Hermanson,D.K., Kimmel,M. et al. The sensitivity of bladder wash flow cytometry, bladder wash cytology, and voided cytology in the detection of bladder carcinoma. Cancer, 60:1423, 1987.
- 9- Badalement,R.A., Kimmel,M., Gay,H., et al: The sensitivity of flow cytometry compared with conventional cytology in the detection of superficial bladder carcinoma. Cancer, 59:2078, 1987.
- 10- Badalement,R.A., O'Toole,R.V., Keyhani-Rofagha S., et al: Flow cytometric analysis of primary and metastatic bladder cancer. J.Urol, 143:912, 1990.
- 11- Baisch,E., Göhde,W., Linden,W.A.: Analysis of PCP data to determine the fraction of cells in the various phases of the cell cycle. Radiat Enuron Biophys 12:31, 1975.
- 12- Barlogie,B., Stass,S., Dixon,D., et al: DNA aneuploidy in adult acute leukemia. Cancer Genet. Cytogneet, 28:2, 1987.

- 13- Barlogie,B., Raber,M.N., Schumann,J. et al: Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Research*. 43:3982, 1983.
- 14- Barnes,R.W., Dick,A.L., Hadley,H.L., et al: Survival following transurethral resection of bladder carcinoma. *Cancer Resm.* 37:2895, 1977.
- 15- Benson R.C. Jr. Tomera,K.M.I, and Kelalis,P.P.: Transitional cell carcinoma of the bladder in children and adolescents. *J. Urol*, 130:54, 1983b.
- 16- Benson,R.C.: Laser photodynamic therapy for bladder cancer. *Mayo Clin. Proc.* 61:859, 1986.
- 17- Bergvist,A., Ljungvist, A., Moberger,G.: Classification of bladder tumors 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*, 130:371, 1965.
- 18- Blobel,G., Patter,V.R.: Nuclei from rat liver: Isolation method that combines purity with high yield. *Science*, 154:1662, 1966.
- 19- Blomjous,C.E.M., Schipper,N.W., Baak,J.P.A. et al: Retrospective study of prognostic importance of DNA flow cytometry of urinary bladder carcinoma, *J. Clin. Pat-hol.* 41:21, 1988.
- 20- Blute,M.L: Transitional cell carcinoma of renal pelvis: Nuclear deoxyribonucleic acid ploidy studied by flow cytometry. *J. Urol*, 140:944, 1988.
- 21- Bretton,P.R., Herr,H.W., Kimmel,M.I, et al: Flow cytometry as a predictor of response and progression in patients with superficial bladder cancer treated with Bacillus Calmette-Guerin. *J. Urol.*, 143:710, 1990.
- 22- Broders,A.C., Epithelioma of the genitourinary organs. *Ann. Surg.*, 75:574, 1922.
- 23- Campo,E., Algaba,R., Palacin,A., et al: Placental proteins in high grade urothelial neoplasms: An immunohistochemical study of human chorionic gonadotropin, human placental lactogen and pregnancy-specific beta-1-glycoprotein. *Cancer*, 63:2497, 1989.
- 24- Cancer Facts and Figures American Cancer Society. 1990.
- 25- Caratero,C., Hijazi,A., Caratero,A., Mazerolles,C., Rischman,P., Sarroman,J.P.: Flow cytometry analysis of urothelial cell DNA content according to pathological and clinical data on 100 bladder tumors. *Eur. Urol.* 1990; 18:1456-149.
- 26- Catalonal (Comp).
- 27- Chin,J., Huben,P.R., Nova,E. et al.: Flow cytometric analysis of DNA content in human bladder tumors and irrigation fluids. *Cancer* 56:1677-1681, 1985.
- 28- Chirstensson,B., Tribukait,B., Linder,I.L., et al: Cell proliferation and DNA content in Hodgkin's lymphoma. Flow cytometry in relation to lymphoma classification. *Cancer* 58:1295, 1986.
- 29- Clavel,J., Cardier,S., Boccan-Gibad,L., et al: Tobacco and bladder cancer in males: Increased risk for inhalers and smokers of block tobacco. *Int. J. Cancer*, 44:605, 1989.
- 30- Cohen,S.M.I, Urinary bladder carcinogenesis: Initiation promotion. *Semin Oncol.*, 6:157, 1979.
- 31- Cole,P., Hoover,R., and Friedell,G.H.: Occupation and cancer of the lower urinary tract. *Cancer*, 29:1250, 1972.

- 32- Coon,J.S., Weinstein,R.S., and Summers,J.L.: Blood group precursor T-antigen expression in human urinary bladder carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.*, 77:692, 1982.
- 33- Coon,J.S., Deitch,A.D., DeVere, White,R.W. et al: Interinstitutional variability in DNA flow cytometric analysis of tumors. The National Cancer Institute's flow cytometry network experience *Cancer* 61:12, 1988.
- 34- Coon,J.S., Landoy,A.L., Weinstein,W.S.: Flow cytometric analysis of paraffin-embedded tumors. Implications for diagnostic pathology. *Hum. Pathol* 117:435, 1986.
- 35- Coon,J.S., Schwartz,D., Summer,J.L., et al: Flow cytometric analysis of deparaffinized nuclei in urinary bladder carcinoma. Comparison with cytogenetic analysis. *Cancer* 57:1594, 1986.
- 36- Creasman,W.T., Weed,J.C., Jr: Carcinoma of the endometrium: Clinical features and management (In) Copplesan (ed): *Gynecologic oncology*, second ed. Vol 2, Churchill Livingstone, London, 1992, pp.775.
- 37- Cutler,S.J., Henry,N.M. and Friedell,G.H.. Longitudinal study of patients with bladder cancer: Factors associated with disease recurrence and progression. in bladder cancer. Edited by W.W. Bonney and G.R.Prout. Williams and Wilkins, Baltimore, 1982, p.35.
- 38- Dalesio,O., Schulmann,C.C., Sylvester,R. et al: Prognostic factors in superficial bladder tumors: A study of the E.O.R.T.C.: Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group. *J. Urol.*, 129:730, 1983.
- 39- Darzynkiewicz,Z., Traganos,F., Kopunscinski, J. et al: Accessibility of DNA in situ various fluorochromosomes: Relationship to chromatin changes during erythroid differentiation of friend leukemia cells. *Cytometry* 5:355, 1984.
- 40- Darzynkiewicz,Z.: Metabolic and kinetic compartments of the cell cycle distinguished by multiparameter flow cytometry. In *Growth, Cancer and the Cell Cycle*. Edited by Skehan,P., New Jersey: Clifton pp 249-278, 1984.
- 41- Darzynkiewicz,Z., Traganos,F., Melamed,M.R.: New cell cycle compartments identified by multiparameter flow cytometry. *Cytometry* 1:95, 1980.
- 42- Darzynkiewicz,Z., Traganos,F., Kimmel,M.: Assay of cell cycle kinetics by multivariate flow cytometry using the principles of stathmokinetics. In: *Techniques of cell cycle analysis*. Edited by Darzynkiewicz,Z., New Jersey: Clifton, pp. 291-336, 1986.
- 43- Darynkiewicz,Z., Crismann,H., Traganos,F. et al: Cell heterogeneity during the cell cycle. *J. Cell Physiol.*, 113:463, 1982.
- 44- Darynkiewicz,Z.: Molecular interactions and cellular changes during the cell cycle. *Pharmacol. Ther.*, 21:143, 1983.
- 45- DeVere White,R.U., Olsson,C.A., Deitsch,A.D.: Flow cytometry: Role in monitoring transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 28:15, 1986.
- 46- DeVere White,R.W., Deitch,A.D., Brian,W., Fitzpatrick,J.M.: The predictive value of flow cytometric information in the clinical management of stage O (Ta) bladder cancer. *J. Urol.*, 139:279, 1988.
- 47- Devonec M: Une nouvelle hypothese sur L'histoire naturelle du cancer de la vessie grace a l'tude du contenu en ADN des tumeurs par la cytometric en flux. *Ann. Urol.*, 21:250, 1987.
- 48- Droller,M.J.: Bladder Cancer. *Curr. Probl. Surg.*, 28:209, 1981.

- 49- Duncan,R.E., Bennet,D.W., Evans,A.J. et al: Radiation-induced bladder tumors. *J. Urol*, 118:43, 1977.
- 50- Ensmley,J.F., Maciorowski,Z., Pietraszkiewski,H. et al. : Solid tumor preparation for clinical application of flow cytometry. *Cytometry* 8:488, 1987.
- 51- Eschenbach,A.C.: Tumors of the bladder, *General Urology*, p:335, 1988.
- 52- Farrow,G.M.I, Utz,D.C. Riffe,C.C. et al: Clinical observations sixty-nine cases of in situ carcinoma of the urinary bladder: *Cancer Res.* 37:2794, 1977.
- 53- Farsund,T., Hostmark,J.G., Laerum,O.D.: Relation between cytometric DNA distribution and pathology in human bladder cancer. *Cancer* 1988; 54:1771-1777.
- 54- Farsund,T., Laerum,O.D., Hostmark,J., Jordfald,G: Local chemotherapeutic effects in bladder cancer demonstrated by selective sampling and flow cytometry. *J. Urol.* 131:22-32, 1984.
- 55- Fossa,S.D., Thorud,E., Vaage,S. et al: DNA cytometry of primary breast cancer. A Comparison of microspectrophotometry and flow cytometry and different preparation methods for flow cytometric measurements. *Acta. Pathol Microbiol Immunol Scand (A)* 91:235, 1983.
- 56- Frankfurt,O.S., Arbuck,S.G., Chin,J.L. et al: Prognostic application of DNA flow cytometry for human solid tumors. *Ann NY. Acad. Sci* 468:276, 1986.
- 57- Frankfurt O.S., Greco,W.R., Slocum H.K., et al: Proliferative characteristics of primary and metastatic human solid tumors by DNA flow cytometry. *Cytometry* 5:629, 1984.
- 58- Folker,M.J., Cooper,E.H. and Toraka T. (1971). Proliferation and ultrastructure of papillary transitional cell carcinoma of the human bladder. *Cancer*, 27, 71-82.
- 59- Fung,C.Y., Shipley,W.D., Young,R.H., et al: Prognostic factors in invasive bladder carcinoma in a prospective trial of preoperative adjuvant chemotherapy and radiotherapy. *J. Clin. Oncol* 9 (9): 1533-42, 1991.
- 60- Gilbert,H.A., Logan,J.L., Kogan,A.R. et al: The natural history of papillary transitional cell carcinoma of the bladder and its treatment in an unselected population on the basis of histologic grading. *J. Urol* 119:488-492, 1978.
- 61- Göhde,W., Dittrich,W.: Impulsfluorometrie-ein neuartiges Durchflussverfahren zur ultraschnellen Mengenbestimmung von Zellinhaltsstoffen. *Acta Histochem* 1971; 10:429-437.
- 62- Haag,D., Feichter,G., Coertler,K. et al: Influence of systematic errors on the evaluation of the S phase portions from DNA distributions of solid tumors as shown for 328 breast carcinomas *Cytometry* 8:377, 1987.
- 63- Hamono,K., Kinjo,M., Kumazawa,J.: Flow-cytometric deoxyribonucleic acid analysis of the human bladder cancers with reference to histopathological findings. *Eur. Urol.* 1992; 22:153-157.
- 64- Harmer,M.H. ed *TNM Classification of Malignant Tumors* ed. 3. Geneva: HICC, 1978; 113-117.
- 65- Hedley,D.W., Friedlander,M.L., Taylor,I.W. et al: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 31:1333, 1983.

- 66- Hedley,D.W., Friedlander,M.L., Taylor,I.W.: Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance. *Cytometry* 6:327, 1985.
- 67- Hedley,D.W., Rugg,C.A., Gelber,R.D.: Association of DNA index and S phase fraction with prognosis of nodes positive early breast cancer. *Cancer Res.* 47:4729, 1987.
- 68- Carbin,B.E., Ekmon,P., Eneroth,P. et al: Urine-TPA, flow cytometry and cytology as markers for tumor invasiveness urinary bladder carcinoma. *Urol. Res.* 17:269, 1989.
- 69- Heney,N.M., Ahmed,S., Flandgon,M.J., Froble,W., et al: I.R. for National Bladder Cancer Collaborative Group A: Superficial bladder cancer: Progression and recurrence. *J. Urol.*, 130:1083, 1983.
- 70- Herr H.W., Badalement,R.A., Amoto D.A., et al: Superficial bladder cancer treated with, Bacillus Calmette-Guerin: A multivariate analysis of factors affecting tumor progression. *J. Urol* 141:22-29, 1989.
- 71- Hiddemonn,W., Schumann,J. Andereff,M., et al: Convention on nomenclature for DNA cytometry. *Cancer Genet Cytogenet* 13:181, 1984.
- 72- Hoffman,D., Masuda,Y., and Wynder,E.L.: Alpha-naphthylamine and beta-naphthylamine in cigarette smoke. *Nature*, 221:254, 1969.
- 73- Holdrinet,R.S.G., Pennigns,A., Drenthe-Schonk,A.M. et al: Flow cytometric determination of the S phase compartment in adult acute leukemia. *Acta Haemotol (Basel)* 70:396, 1985.
- 74- Hopman,A. H.N., Poddighe,P.T., Smeets,A.W. G.B. et al: Detection on numerical chromosome aberrations in bladder cancer by in situ hybridization. *Am. J. Clin. Pat-hol.*, 135:1105, 1989.
- 75- Haron,P.K., Slezok,S.E., Poste,G.: Improved flow cytometric analysis of leucocyte subsets: Simultaneous identification of five cell subsets using two-color immunofluorescence. *Proc.Nat. 1. Acad. Sci USA* 83:8361, 1986.
- 76- Huben,R.P.: Tumor markers in bladder cancer. *Urology* 23:10, 1984.
- 77- Hug,E.B., Donnely,S.M., Shipley,W.J. et al: Deoxyribonucleic acid flow cytometry in invasive bladder carcinoma: A possible predictor for successful bladder preservation following transurethral surgery and chemotherapy-radiotherapy. *J. Urol.* 148:47-51, 1992.
- 78- Hussain,A.a., Reinhard,N.: Transitional cell carcinoma of the urinary bladder clinical relevance of DNA-Ploidy: A study by means of static DNA-cytophometry.
- 79- Jauodpour,N.: Multiple cell markers in bladder cancers: Principles and clinical practice. *Urol. Clin. North Am.* 11:609, 1984.
- 80- Jewett H.J. and Strong G.H.: Infiltrating carcinoma of the bladder: Relation of depth of penetration of the bladder wall to incidence of lokal extension and metastases: *J. Urol.*, 55:366, 1946.
- 81- Johnston,D.a., White,R.A., Barlogie,B.: Automatic processing and interpretation of DNA distributions. Comparison of several techniques *Comput Biomed Res* 11:393, 1978.

- 82- Jordan,A.M., Weingorten,J., Murphy,W.M.: Transitional cell neoplasms of the urinary bladder: Can biologic potential be predicted from histologic grading? *Cancer* 60:2766-2774, 1987.
- 83- Kamentsky,L.A., Derman,H., Melamed,M.R.: Ultraviolet absorbtion of epidermoid cancer cells. *Science* 142:1580y 1963.
- 84- Kamentsky,.L.A., Memaled,M.R.: Spectrophotometric cell sorter *Science* 156:1364, 1967.
- 85- Kamentsky,L.A., Melamed,M.R., Dierman,H.: Spectrophotometer: New instrument for ultrarapid cell analysis. *Science* 150:630, 1965.
- 86- Kaye,K.W., Lange,P.W.: Mode of presentation of invasive bladder. *Cancer Reassessment of the problem. J. Urol.* 128:31, 1982.
- 87- Kenn,G.M., Hardener,G.J., Murphy,G.P.: Clinical staging of bladder tumors. *J. Urol* 1970; 104:720-723.
- 88- Klein,F.a., Herr,H.W., Sogani,P.C. et al: Detection and follow-up carcinomas of the urinary bladder by flow cytometry.
- 89- Klein,F.a., Herr,H.W., Sogani,P.C. et al: Flow cytometry of normal and nonneoplastic diseases of the bladder: An estimate of the false positive rate. *J. Urol.* 127:946-948, 1982.
- 90- Korkud,G., Karabay.K. Mesane tümörleri, *Üroloji* s.375-396, 1985.
- 91- Koss,L.G., Wolley,R.C., Schreiber,K. et al.: Flow microfluorometric analysis of nuclei isolated form various normal and malignant human epithelial cells. *J. Histochem. Cytochem.* 25:565, 1977.
- 92- Koss,L.G., Wersto,R.P., Simmons,D.H. et al: Predictive value of DNA measurements in bladder washings. Comparison of flow cytometry, imagecytophotometry and cytology of voided urine in patients with past history of urothelial tumors. *Cancer* (in press).
- 93- Koss,L.G., Tumors of urinary bladder. In: Koss,L.G. ed. *Atlas of Tumor Pathology, Fascicle Series 2.* Washington D.I.C.: Armed forces Institue of Pathology, 1967.
- 94- Kenneth B.C., Joseph,G.B., Stewen,W.B.: Diagnosis and staging of bladder cancer. In: *The Urologic Clinics of North America. Vol: 19. Number 3 Philadelphia, W.B.-Saunders Company.* 1992.
- 95- Krishan,A.: Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J. Cell Biol* 66:1878, 1975.
- 96- Kuntreer,A.F., Hartge,P., Hoover,R.N. et al: Urinary tract infection and risk of bladder cancer. *Am. J. Epidemiol,* 119:510, 1984.
- 97- Lamm,D.L., Blumenstein,B.A., Crawford,E.D., et al: A randomized trial of intravesical doxorubicin and immunotherapy with Bacille Calmette-Guerin for transitional cell carcinoma of the bladder. *N. Engl.J.Med.,* 325:1205, 1982.
- 98- Langkilde,N.C., Wolff,H. and Armtoft,J.F.: Lectinohistochemistry of human bladder cancer: Loss of lectin binding structures in invasive carcinomas. *APMIS,* 97:367, 1989.
- 99- Lerman,R.II., Hutter,R.V.P., Whitmore,W.F.: Papilloma of the urinary bladder. *Cancer* 25:333, 1970.

- 100- Lipponen,P.K., Eskelinen,M.J., Kiviranta,J. et al: Prognosis of transitional cell bladder cancer: a multivariate prognostic score for improved prediction. *J. Urol.*, 146(6):1535, 1991.
- 101- Locke,J.L. Hill,D.E., Walzer,Y.: Incidence of squamos cell carcinoma in patients with long-term catheter drainage. *J. Urol.*, 133:1034, 1985.
- 102- Lutz,M..H., Underwood PB, Kreutner,A., Miller,M.C.: Endometrial carcinoma. A new method of classification of therapeutic and prognostic significance.
- 103- LutzeyerW., Rubben,H., Dahm,H.: Prognostic parameters in superficial bladder cancer: An analysis of 315 cases: *J. Urol.*, 127:250, 1982.
- 104- Malmström,P., Busch,C., Norlen,B.J.: Recurrence, progression and survival in bladder cancer: A retrospective analysis of 232 patients with less than 5 year follow up. *Scand J. Urol. Nephrol* 21:185, 1987.
- 105- Masters,J.R.W., Camplejohn,R.S., Parkinson,C.: Dna ploidy and the prognosis of stage pT1 bladder cancer. *Brit. J. Urol*, 64:403, 1989.
- 106- Mayall,B.H., Casperion,T.O.: Curriculum Vitae and Selected Publications. *Cytometry* 5:314, 1984.
- 107- Meilamed,M.R., Mullaney,P.R., Mendelshon,M.L.: Flow cytometry and sorting, New York, Wiley 1979.
- 108- Mendecki,J., Dilmam,W.H., Wolley,R.C.: Effect of thyroid hormone on the ploidy of rat Liver nuclei as determined by flow cytometry. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 158:63, 1978.
- 109- Merkel,D.E., Dressler,L.G., McGuire,W.L.: Flow cytometry, cellular DNA content and prognosis in human malignancy. *J. Clin. Oncol.* 5:1690, 1987.
- 110- Messing,E.M.: Clinical implications of the expression of epidermal growth factor receptor in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res.*, 50:2530, 1990.
- 111- Miles,C.: Chromosome analysis of solid tumors I. Twenty-eight non-epithelial tumors. *Cancer*, 20:1253, 1967.
- 112- Miles,C.: Chromosome analysis of solid tumors II. Twenty-six epithelial tumors. *Cancer*, 20:1274, 1967.
- 113- Morrison,A.S., and Cole,P: Epidemiology of bladder cancer *Urol. Clin. North. Am.* 3:13, 1976.
- 114- Murphy W.M.: Carcinoma in situ and dysplasia of the urethelium In: *Cytopathology Annual*. Ed. Schmidt W.A. Williams and Wilkins, Baltimore, pp:103-118, 1992.
- 115- MurphyW.M., Emerson,L.D., Chandler,R.W. et al: Flow cytometry versus urinary cytology in the evaluation of patients with bladder cancer. *J. Urol.*, 136:815, 1986.
- 116- Murphy,W.M., Chandler,R.W., Trafford,R.M.: Flow cytometry of deparaffinized nuclei compared to histological grading for the pathological evaluation of transitional cell carcinomas. *J. Urol.*, 135:694, 1986.
- 117- Neal,D.E., Sharples,L., Stimh,K., et al: The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer* 65:1619, 1990.

- 118- Nervi,C., Bradaracca,G., Morelli,M., et al: Cytokinetic evaluation in human head and neck cancer by autoradiography and DNA cytofluorometry. *Cancer*, 45:452, 1980.
- 119- Norming,U., Tribukait,B., Gustafson,H., et al: DNA profile and tumor progression in primary carcinoma in situ of the bladder: A study of 63 patients with grade 3 lesions. *J. Urol.*, 147:11, 1992.
- 120- Norming,U., Tribukait,B., Nyman,c.R., etal: Prognostic significance of mucosal aneuploidy in stage Ta/T₁ grade 3 carcinoma of the bladder. *J. Urol.*, 148:1420, 1992.
- 121- Nowell,P.C.: Chromosome changes and the clonal evolution of cancer. In: German J, ed. *Chromosomes and cancer*. New York: Wiley and Sons., pp:267-285, 1974.
- 122- Oljons,P.J., Tanke,H.J.: Flow cytometric analysis of DNA content in bladder cancer: prognostic value of the DNA index with respect to early tumor recurrence in G₂ tumors. *World J. Urol*, 4:205, 1986.
- 123- Orihuela,E., Shahon,R.S: Influence of blood group type on the natural history of superficial bladder cancer. *J. Urol.*, 138:758, 1987.
- 124- Orihuela,E., Varadachay,S., Herr,H.W.: The practical use of tumor markers determination in bladder washing specimens assessing the urothelium of patients with superficial bladder cancer. *Cancer*, 60:1009, 1987.
- 125- Parada,L.F., Tabin,C.J., Shih,C., et al: Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature*, 297:474, 1982.
- 126- Prout G.R., Jr., Griffin,P.P., Daly,J.J.: Carcinoma in situ of the urinary bladder with and without associated vesical neoplasms. *Cancer* 52:524, 1983.
- 127- Renwick A.G., Thakrar,A., Lawrie,C.A., et al: Microbial amino acid metabolites and bladder cancer: No evidence of promoting activity in man. *Hum. Toxicol.*, 7:267, 1988.
- 128- Riley,R.S., Mahin,E.J.: Clinical applications of flow cytometry, ASCP National Meeting, Washington,D.C., 1989.
- 129- Romero,J., Alos,L., Mallofre,C., etal: Bladder wash cytology and flow cytometry for the diagnosis of transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur. Urol.*, 21 (Suppl):13, 1992.
- 130- Rosai,J.: *Ackerman's Surgical Pathology* 7th ed. St.Louis, Toronto, Washington,D.C.: The C.V. Mosby Co., pp 964-13, 1989.
- 131- Saracino,G.A., Ditanno,P., Disabato,G. et al.: Prediction of recurrence and progression in primary superficial bladder cancer with DNA flow cytometry. *Eur. Urol*, 21 (Suppl 1):26, 1992.
- 132- Schneller,J., Epprch,E., Grenebaum,E. et al: Flow cytometry and Feulgen cytophotometry in evaluation of effusions. *Cancer* 59:1307, 1987.
- 133- Schmidt,J.D., Weinstein,J.H.: Pitfalls in clinical staging of bladder tumors. *Urol. Clin. North Aml.*, 3:107, 1976.
- 134- Shaaban,A.A., Tribukait,B., Abdel-Fattah,A., et al: Prediction of lymph node metastases in bladder carcinoma with deoxyribonucleic acid flow cytometry. *J. Urol.* 144:884, 1990.

- 135- Shankley,T.V.: Presented at: The Coulter cytometry midwest users meeting, Arlington Heights, Illinois, 1991.
- 136- Sella,A., Dexeus,F.H., Chang,C. et al: Radiation therapy associated invasive bladder tumors. *Urology*, 33:185, 1989.
- 137- Shaphiro,H.M.: *Practical flow cytometry*, New York, Liss, 1985.
- 138- Sidransky,D., Von Eschenbach,A., Isai,Y.c., et al: Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 252:706, 1991.
- 139- Silverio,F.Di, von Heland, M., Berardinis,E.D., et al: Prognostic role of flow cytometry in superficial bladder cancer. *Eur. Urol*, 21 (Suppl 1):22, 1992.
- 140- Skinner,D.G.: Current state of classification and staging of bladder cancer. *Cancer Res.*, 37:2838, 1977.
- 141- Smith G., Elton,R.A., Beynon,L.L.: Prognostic significance of biopsy results of normal looking mucosa in cases of superficial bladder cancer. *Br.J.Urol.*, 55:665, 1983.
- 142- Soloway,M.S.: Treatment of superficial bladder cancer with intravesical mitomycin C: Analysis of immediate and long term response in 70 patients. *J. Urol.*, 134:1107, 1985.
- 143- Soloway,M.S., Morrison,D.A., Shelton,T.B: Modalities used in the diagnosis, staging and evaluation of bladder cancer. *AUA Update series* 4:1-7, 1985.
- 144- Sontag,J.M.: Experimental identification of genitourinary carcinogens. *Urol. Clin. North Am.*, 7:803, 1980.
- 145- Sonta,S., Oshimura,M., Evans,J.T., Sandberg,A.A.: Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XX. Banding patterns of primary tumors. *J. Natl. Cancer Inst* 1977; 58:49-59.
- 146- Sonta,S., Sandberg,A.A.: Chromosomes and causation of human cancer and leukemia XXX. Banding Studies of primary intestinal tumors. *Cancer*, 41:153, 1978.
- 147- Summers,J.L., Falor,W.H., Ward,R.: A ten year analysis of chromosomes in noninvasive papillary carcinoma of the bladder *J.Urol.*, 125:177, 1981.
- 148- Tachibana,M., Deguchi,N., Jitsukawa,S. et al: Quantification of cell kinetic characteristics using flow cytometric measurements of deoxyribonucleic acid and bromodeoxyuridine for bladder cancer. *J. Urol.*, 145:963, 1991.
- 149- Thornwaite,J.T., Sugarbaker,E.V., Temple,W.J.: Preparation of tissues for DNA flow cytometric analysis. *Cytometry* 1:229, 1980.
- 150- Thornwaite,J.F., Seckinger,D., Sugarbaker,E.V., et al: Dual immunofluorescent analysis of human peripheral blood lymphocytes. *Am. J. Clin. Pathol.* 82:48, 1984.
- 151- Tingje,M., Ze,W., Nianli,S. et al: Clinical significance of flow cytometry deoxyribonucleic acid measurements of deparaffinized specimens in bladder tumors. *Eur. Urol.*, 21:98, 1992.
- 152- Traganos,F.: Flow cytometry. Principles and applications.II. *Cancer invest* 2:239, 1984.

- 153- Tribukait,B., Gustafson,H., Esposti,P.: Ploidy and proliferation in human bladder tumors as measured by flow-cytofluorometric DNA-analysis and its relations to histopathology and cytology. *Cancer* 43:1742, 1979.
- 154- Tribukait,B., Gustafson H., Esposti,P.: The significance of ploidy and proliferation in the clinical and biological evaluation of bladder tumors: a study of 100 untreated cases. *Br.J.Urol.*, 54:130, 1982.
- 155- Tribukait,B.: Clinical DNA flow cytometry. *Med. Oncol. Tumor Pharmacother.* 1:211, 1984.
- 156- Tribukait,B: Flow cytometry in surgical pathology and cytology of tumors of the genitourinary tract. *Adv. Clin. Cytol.* 2:163, 1984.
- 157- Tricker,A.R., Mostafa,M.H., Spiegelhalder,B., et al: Urinary excretion of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds in schistosomiasis and bilharzial bladder cancer patients. *Carcinogenesis*, 10:547, 1989.
- 158- Trujillo,J.M., Cork,A., Ahearn,M.J., Youness,E.L., Me Credie,K.B.: Hematologic and cytologic characterization of 8/21 translocation acute granulocytic leukemia. *Blood*, 53:625-706, 1979.
- 159- Trujillo,J.M., Cork,A., Hart,J.S.: Clinical implications of aneuploid cytogenetic profiles in adult acute leukemia. *Cancer* 33:824, 1974.
- 160- Tsai,Y.C., Nichols,P.W., Hitti,A.L., et al: Allelic losses of chromosomes 9,11 and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res.*, 50:44, 1990.
- 161- Umiker,W.: Accuracy of cytologic diagnosis of cancer of the urinary tract. *Acta. Cytol*, 8:186, 1964.
- 162- Utz,D.C.: Editorial comment. *J. Urol.*, 130:1086, 1983.
- 163- Vanni,R., Peretti,D., Scorpa,R.M. et al: Cytogenetics of bladder cancer0 Rearrangements of the short arm of chromosome 11. *Cancer Detect. Prev.*, 10:401, 1987.
- 164- Vindelev,L.L., Christensen,J.J., Nissen,N.I.: A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 3:323, 1983.
- 165- Volm,M., Mattern,J., Muller,t. et al: Flow cytometry of epidermoid carcinomas: Relationship of ploidy and cell cycle phases to survival. A five year follow-up study. *Anticancer Res.* 8:105, 1988.
- 166- Wensmtein,I.B., Troll,W. National Cancer Institute workshop on tumor promotion and cofactors in carcinogenesis. *Cancer Res.*, 37:3461, 1977.
- 167- Weinstein,R.S.: Evolving concepts of the cancer cell. In Bonney W., Prout G. (eds): *Bladder Cancer*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1982.
- 168- Wersto,R.P., Greeneboum.,E., Deitsch,D. et al: deoxyribonucleic acid ploidy and cell cycle events in benign colonic epithelium peripheral to carcinoma. *Lab. Invest* 58:218, 1988.
- 169- World Health Organisation. Histological typing of urinary bladder tumors. In: *International Classification of Tumors* no: 10 Geneva 1973.
- 170- Wiley,E.L., Mendelsohn,G., Droller,M. et al: Immunoperoxidase detection of carcino-embryonic antigen and blood group. Substances in papillary transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Urol*, 128:276, 1982.

- 171- Wilson,M.G., Towner,J.W., Fujimoto,A.: Retinoblastoma and D-chromosome deletions. *Am. J. Hum Genet.* 1973 25:57-61.
- 172- Wijkström,H., Granberg,Öhman,I., Tribukait,B.: Chromosomal and DNA patterns in transitional cell bladder carcinoma *Cancer* 53:1718-1723, 1984.
- 173- Wolf,H., Hojgaard,K.: Urothelial dysplasia concomitant with bladder tumor as a determinant factor for future new occurrences. *Lancet* 2:134-136 1983.
- 174- Wolley,R.C., Schreiber,K., Koss,L.G. et al.: DNA distribution in human colonic carcinomas and its relationship to clinical behaviour *JNCI* 69:15, 1982.
- 175- Wolley,R.C., Herz,F., Koss,L.G.: Caution on the use of lymphocytes as standarts in the flow cytometric analysis of cultured cells. *Cytometry* 2:370, 1982.
- 176- Zdeb,M.S.: The probability of developing cancer. *Am. J. Epidemiol* 106:6, 1977.
- 177- Santos,E. Tronick,S.R., Aoronson,S.A. et al: T₂₄ human bladder carcinoma oncogene is activated form of normal human hamdop of BALB-and Harvey MSV transforming enes. *Nature* 298:343, 1982.
- 178- Piper,J.M., Tonascia,J. and Metanoski,G.K.: Heavy phenacitin use and bladder cancer in women aged 20 to 49 years. *N. Engl. J. Med.* 313:292, 1985.
- 179- Murphy,W.M.: Current status of urinary cytology in the evaluation of bladder neoplasms. *Hum. Path.* 21:9 1990.
- 180- Wijkström,H., Tribukait,B.: Deoxyribonucleic acid flow cytometry in predicting response to radikal radiotherapy of bladder cancer. *J. Urol.* 144: 646 1980.
- 183- Giella,J.g., Kenneth,R., Carl,A.D., et al.: The predictive value of flow cytometry and urinary cytology in the follow up of patinets with transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Urol.*, 148:293, 1992.
- 184- Evans,D.A.P., Eze,L.C., Whibley,E.J.: The association of slow acetylator phenotype with bladder cancer *J. Med. Genet.* 20:330, 1983.
- 185- Liotta,L.A., Mandler,R., Murano,G. et al.: Tumor cell antarine motility factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:3302, 1986.
- 186- Hasui,Y., Suzumiya,J., Marutsuka,K., et al.: Comparative study of plasminogen activators in cancers and normal mucose of human urinary bladder. *Cancer Res.*49:1067, 1989.
- 187- Carbin,B.E., Ekman,P., Eneroth,P., et al.: Urine TPA, flow cytometry and cytology as markers for tumor invasiveness in urinary bladder carcinoma. *Urol. Res.* 17:269, 1989.
- 188- Smith,N.W., Strutton,G.M., Walsh,M.D. et al.: Transferrin receptor expression in primary superficial human bladder tumors identifies patients who develop recurrences *Br. J. Urol.* 65:339, 1990.
- 189- de Vita,R., Forte,D., Maggi,F., et al.: Cellular DNA content and proliferative activity evaluated by flow cytometry versus histopathological staging classifications in human bladder tumors, *Eur. Urol.* 19:65, 1991.

T.G. VIKSERÖGRETION
DOKUMENTASTION