

**T.C.**  
**ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MESANE KARSİNOMLARINDA SİKLİN D1, SİKLİN E1**  
**RB, E2F1 VE P27 GEN EKSPRESYONLARININ**  
**PROGNOSTİK FAKTÖRLERLE İLİŞKİSİ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DR. GÜLAN AKTAŞ**

**BOLU 2015**

**T.C.**  
**ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MESANE KARSİNOMLARINDA SİKLİN D1, SİKLİN E1**  
**RB, E2F1 VE P27 GEN EKSPRESYONLARININ**  
**PROGNOSTİK FAKTÖRLERLE İLİŞKİSİ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**  
**DR. GÜLAN AKTAŞ**

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ**  
**PROF. DR. ÇETİN BORAN**

**BOLU 2015**

## TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübesi ile daima yol gösterici olan anabilim dalı başkanı, değerli hocam Prof. Dr. Fahri Yılmaz'a, asistanlık eğitimimin ilk günlerinden itibaren değerli bilgilerinden faydalandığım, tez danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Çetin Boran'a, bilgi ve birikimlerini bizlerle paylaşan desteklerini her zaman hissettiğim değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. H. Müzeyyen Astarıcı ve Yrd. Doç. Dr. Gülzade Özyalvaçlı'ya,

Tezimin istatistik danışmanlığını yapan Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Aysu Kıyan'a, hastaların belirlenmesi ve veri toplamamda yardımcı olan Üroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Mehmet Emin Özyalvaçlı'ya

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, her zaman yardımları ve dostluklarıyla yanımda olan asistan arkadaşlarım Dr. Hilal Ahsen, Dr. Hüsnâ Özçelik, Dr. Ertunç Çinpolat'a,

Tezimi hazırlarken yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım laboratuvar ve sekreterlik çalışanlarına,

Son olarak bugünlere gelmemde en büyük emek ve özveriyi gösteren canım annem ve babama, fedakarlıkla her zaman yanımda olan sevgili eşim Mehmet Aktaş'a ve hayatımın anlamı biricik oğlum Alperen Aktaş'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                         |            |
|-------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>ÖZET</b>                                                             | <b>111</b> |
| <b>SUMMARY</b>                                                          | <b>IV</b>  |
| <b>1 GİRİŞ</b>                                                          | <b>1</b>   |
| <b>2 GENEL BİLGİLER</b>                                                 | <b>2</b>   |
| 2.1 Embriyoloji                                                         | 2          |
| 2.2 Anatomi                                                             | 2          |
| 2.3 Histoloji                                                           | 2          |
| 2.4 Mesane kanserleri                                                   | 3          |
| 2.4.1Epidemiyoloji                                                      | 3          |
| 2.4.2 Etyoloji ve risk faktörleri                                       | 3          |
| 2.4.3 Moleküler ve genetik özellikler                                   | 4          |
| 2.4.4 WHO 2004 Ürotelyal tümörlerin histolojik klasifikasyonu           | 5          |
| 2.4.5 Ürotelyal karsinomlarda TNM klasifikasyonu                        | 6          |
| 2.4.6 Ürotelyal tümörlerin histopatolojik özellikleri ve derecelendirme | 7          |
| 2.4.7 Düşük dereceli non-invaziv papiller ürotelyal karsinom            | 8          |
| 2.4.8 Yüksek dereceli non-invaziv papiller ürotelyal karsinom           | 8          |
| 2.4.9 İnfiltratif ürotelyal karsinom                                    | 8          |
| 2.4.10 Düşük dereceli invaziv ürotelya karsinom                         | 9          |
| 2.4.11 Yüksek dereceli invaziv ürotelyal karsinom                       | 9          |
| 2.5 Prognostik faktörler                                                | 10         |
| 2.6 Hücre siklusu                                                       | 12         |
| 2.6.1 Hücre siklusu ve hücre replikasyonunun düzenlenmesi               | 12         |
| 2.6.2 Siklin D ve Rb fosforilasyonu                                     | 13         |
| 2.6.3 G1/S Kısıtlama noktasından öteye hücre siklusunun ilerlemesi      | 13         |
| 2.6.4 Hücre siklusu inhibitörleri                                       | 14         |
| 2.6.5 Hücre Siklusunda kontrol noktaları                                | 14         |

|                                          |           |
|------------------------------------------|-----------|
| 2.7 Ki 67 proliferasyon indeksi          | 14        |
| <b>3 GEREÇ VE YÖNTEM</b>                 | <b>16</b> |
| 3.1 Olgu seçimi                          | 16        |
| 3.2 İmmünohistokimyasal inceleme         | 16        |
| 3.3 İmmunreaktivitenin değerlendirilmesi | 17        |
| 3.4 İstatistiksel değerlendirme          | 17        |
| <b>4 BULGULAR</b>                        | <b>19</b> |
| 4.1 Klinik ve patolojik bulgular         | 19        |
| 4.2 İmmünohistokimyasal bulgular         | 21        |
| 4.2.1 Siklin D1                          | 23        |
| 4.2.2 Siklin E1                          | 24        |
| 4.2.3 Rb                                 | 25        |
| 4.2.4 E2F                                | 26        |
| 4.2.5 p27                                | 26        |
| <b>5 TARTIŞMA</b>                        | <b>30</b> |
| <b>6 SONUÇ</b>                           | <b>36</b> |
| <b>7 KAYNAKLAR</b>                       | <b>38</b> |

## ÖZET

**Mesane karsinomlarında siklin D1, siklin E1, Rb, E2F1 ve p27 gen ekspresyonlarının prognostik faktörlerle ilişkisi, tıpta uzmanlık tezi, Bolu 2015.**

Mesane kanseri dünya çapında sık görülen, tekrarlayan kontroller ve tedaviler nedeniyle hasta başına maliyeti en yüksek kanser tipidir. İleri evre tümörler daha agresif seyir gösterir. Elimizdeki mevcut veriler ürotelyal karsinomlarda erken teşhis ve uygun tedavinin önemini vurgulamaktadır. Mesane tümörlerinde hücre siklusunda görev alan genlerde çeşitli anormallikler bulunduğu ve bunların prognostik faktörlerle ilişkili olduğuna dair güçlü kanıtlar mevcuttur. Hücre siklusu ile ilgili markırların kombine kullanımının prognozun belirlenmesi ve hastalarda bireysel tedavi rejimlerinin düzenlenmesinde daha faydalı olacağı gösterilmiştir.

Bu çalışmada mesanenin ürotelyal karsinomlarında hücre siklusunda önemli görevleri olan siklin D1, siklin E1, E2F1, Rb ve p27 gen ekspresyonlarının histolojik derece, evre, proliferatif indeks, rekürrens, progresyon, lenf nodu metastazı gibi prognostik faktörlerle ilişkisini araştırmak amaçlanmıştır.

Çalışma grubumuz 2004-2013 yılları arasında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilimdalı tarafından ürotelyal karsinom tanısı verilen 22 adet sistektomi ve 64 adet transüretral rezeksiyon (TUR) materyali olmak üzere toplam 86 adet olgudan oluşmaktadır. Bölümümüz arşivinden hastalara ait uygun bloklar çıkarılarak H&E ve immünohistokimyasal olarak siklin D1, siklin E1, E2F, Rb, p27 ve ki-67 çalışıldı.

Çalışma sonucunda yüksek gradeli tümörlerde siklin D1 ve Rb ekspresyonu azalırken, E2F1 ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Benzer şekilde kas invazyonu gösteren tümörlerde siklin D1'in düşük eksprese olduğu görülmektedir. E2F1'in grade, rekürrens ve ki-67 proliferatif indeksi ile anlamlı ilişkisi mevcuttur. Elde edilen sonuçlar yüksek E2F1 ekspresyonunun rekürrens ve kötü prognozu tahmin etmede önemli bir belirteç olduğunu göstermektedir. Hücre siklüsündeki birliktelikleri de göz önüne alındığında RB ve E2F1'in bir arada kombine prognostik markır olarak kullanılması daha anlamlı ve belirleyici olacaktır.

## SUMMARY

**Significance of Cyclin D1, Cyclin E1, E2F1, Rb and p27 gene expressions in the prognosis of bladder carcinoma. Thesis of expertise in Medicine, Bolu 2014.**

Bladder carcinoma is the common type of cancer in the world, which has the highest cost per patient because of the recurrent controls and treatments. Advanced stage tumours are more aggressive. Present data emphasize the importance of early diagnosis and appropriate treatment in urothelial carcinoma. There are strong evidences about various anomalies in genes assigned in cell cycle and these anomalies has relationship with prognostic factors such as grade and stage. The combined use of markers on cell cycle are shown more useful in the detection of prognosis and regulation of individual treatment regimes of patients.

The purpose of this study is to examine the relationship between the gene expressions of cyclin D1, cyclin E1, Rb, E2F1 and p27 which have important roles in cell cycle and prognostic factors such as grade, stage, proliferative index, recurrence, progression and lymph node metastasis.

We analyses 86 cases, including 22 cystectomy and 64 transurethral resection material, which was diagnosed with the urothelial carcinoma between the years of 2004-2013 by the Department of Pathology Abant İzzet Baysal University Medical Faculty. Rotine histological paraffin scctions were obtained and stained with cyclin D1, cyclin E1, Rb, E2F1, p27 and ki-67 as H&E and immunohistochemically.

As a conclusion, decreased cyclin D1 and Rb expression and increased E2F1 expression in the high-grade tumors was observed. Similarly, tumors observed muscle invasion expressed decreased cyclin D1. E2F1 is significantly associated with grade, recurrence and Ki-67 proliferative index. The results obtained demonstrate that high E2F1 expression is an important marker for predicting recurrence and poor prognosis. When considered association of Rb and E2F1 in the cell cycle, they will be more significiant and predictive prognostic marker as they combined together.



## 1. GİRİŞ

Mesane karsinomları, etyolojileri, tanı ve tedavilerindeki önemli gelişmelere rağmen hala yüksek morbidite ve mortalite nedeni olmaya devam etmektedirler.

Mesane karsinomları, ilk tanıda %85'i lokalize %15'i metastaz evresindedir. Yeni saptanan mesane karsinomlarının %70'i yüzeysel kanserlerdir, bunların %60-70'i rekürrens gösterir ve %10-20'si progrese olarak invaziv ya da metastatik hastalığa dönüşür (1). Bu veriler mesane karsinomlarında prognostik belirteçlerin önemini arttırmaktadır. Histolojik derece, invazyon derinliği, lenf nodu metastazı, uzak metastaz ve vasküler invazyonun varlığı gibi parametreler mesane tümörlerinde rekürrens, progresyon ve sağ kalım süresini öngörmede kullanılan konvansiyonel prognostik faktörlerdir. Mesane tümörlerinin onkogenezinde moleküler yollara ait bilginin giderek artması, bu tümörlerin biyolojik davranışlarının tahmin edilmesine ve böylece yeni prognostik faktörlerin ortaya çıkmasına olanak sağlamaktadır. Bu yeni prognostik faktörler progresyon ve metastaz gelişmeden optimal tedavi verilmesini de mümkün kılabilir (2).

Mitra ve arkadaşlarının yaptıkları çok sayıda çalışmada (3-7) mesane kanseri gelişimi ve ilerlemesinin, çeşitli hücresel yollarda değişikliklerle bir arada olduğunu göstermiştir. Hücre siklusu ile bağlantılı markırlarda yaygın moleküler sapma olduğu ve bu markırların bireysel değişikliklerinin prognostik faktörler ile ilişkili olduğu belirtilmektedir.

Dancik ve arkadaşları 1968 hastayı kapsayan çalışmalarında (8); mesane ve akciğer karsinomlarında hücre siklusunu düzenleyen gen ekspresyonlarında değişiklikler tespit etmiş, bu değişikliklerin prognoz ve hayatta kalma süresini belirlemede özel bir önem ifade ettiğini yayınlamışlardır.

Siklin D1, Siklin E1, Rb, E2F1 ve p27 hücre siklusunda önemli rolleri olan başlıca genlerdendir. Biz çalışmamızda mesane ürotelyal karsinomlarında siklin D1, siklin E1, E2F1, Rb ve p27 genlerindeki moleküler sapmaları irdeleyerek, ulaşılabilecek sonuçların prognoz tahmininde kullanılmasını amaçlamaktayız. Tümör prognozunun bilinmesi uygun tedavi yönteminin seçilmesini, dolayısıyla yaşam süresinin ve yaşam kalitesinin artmasını sağlayacaktır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Embriyoloji**

Mesane epiteli ürogenital sinüsün endoderminden köken alır. Lamina propria, muskularis propria ve adventisya splenik mezenşimden gelişir. Erken embriyolojik gelişme sırasında, mezonefrik kanalın kaudal kısmı trigon mukozasının şekillenmesine katkıda bulunur, fakat sonunda yerini endoderm alır. Renal pelvis ve üreterler mezoderminden köken alırlar (9).

### **2.2. Anatomi**

Mesane boşken ters çevrilmiş bir piramid gibidir; dolu iken yuvarlak bir yapıya sahiptir. Mesane, kadında uterus ve vajinanın önünde, erkekte prostatın süperiorunda, veziküla seminalislerin anterosüperiorunda bulunur. Süperior yüzey pelvik parietal peritonla örtülüdür. Posterior yüzey taban olarak da bilinir, inferior ve posterior yüzlere sahiptir. Trigon mesanenin tabanında olup, mesane boynu ile devamlılık göstererek üretraya açılır. Mesanenin üretraya açıldığı yere ostium üretra internum denir. Mesanenin posterior anatomik komşulukları klinik olarak çok önemlidir. Çünkü posterior duvardan kaynaklanan tümörler, invazyonla yumuşak dokuya ve komşu organlara yayılabilirler (10, 11). Mesaneye ana kan akımı internal iliak arterlerin dalları ile gelir. Bunlardan arteria vezikalis süperior mesanenenin üst ve ön kısmını; arteria vezikalis inferior ise mesane tabanını besler. Mesanenin venöz drenajı internal iliak vene olur. Mesanenin lenfatik drenajı ise başlıca eksternal ve internal iliak nodlara, mesane boynu bölgesi ise kommon, eksternal veya internal iliak nodlara olur (10-12). Mesane sempatik ve parasempatik sinirlere sahiptir. Sempatik sinirlerini T11-L2 segmentlerinden; parasempatikleri ise S2-4 seviyesinden alır ve bunlar inferior hipogastrik pleksusa gelirler (13).

### **2.3. Histoloji**

Mesane içten dışarıya doğru mukoza, muskularis propria ve adventisya tabakalarından oluşur. Kubbe kısmında adventisya periton ile döşelidir. Mukoza epitel, lamina propria ve nadiren kesintili ya da devamlılık halindeki muskularis mukozadan oluşur. Epitel geleneksel olarak transizyonel olarak adlandırılrsa da ürotelyum terimi daha bilgi verici ve daha doğrudur. Mesane boş iken epiteli 6-7

hücre tabakasından oluşur, dolu olduğunda ise 2-3 hücre tabaka kalınlığına iner. Epitelde üç tabaka vardır; yüzeysel, intermediyer ve bazal tabaka. Yüzeysel tabaka tek sıra, elips şeklinde ve geniş eozinofilik sitoplazmalı hücrelerden oluşur. Bu hücreler “şemsiye” hücreleri olarak adlandırılırlar (14). İntermediyer hücreler küboidal - düşük kolumnar şekilli, ince kromatin paternine sahip, oval nükleuslu, sitoplazmaları orta miktarda ve sitoplazmik sınırları belirgin hücrelerdir. Bazal tabaka, ince bazal lamina üzerine oturmuş tek sıralı küboidal hücrelerden oluşur (15).

Lamina propria, zengin vasküler yatağa sahip, lenfatik damarlar ve birkaç elastik lif içeren gevşek bağ dokudan oluşur. Lamina propriada genellikle izole bantlar şeklinde, bazen kesintili (nadiren devamlılık gösteren) ince bir tabaka halinde düz kas hücreleri izlenebilir. Düz kas hücreleri tabaka halinde izlenirse muskularis mukoza olarak adlandırılırlar.

Muskularis propria iç ve dış longitüdinale tabaka ile bunlar arasında yer alan santral sirküler tabakalara ayrılmıştır. Bu tabakalar en fazla mesane boyun bölgesinde farklılaşmıştır.

Matür yağ hücre grupları özellikle lamina proprianın derin kısmı olmak üzere tüm mesane duvarında yaygın olarak izlenir (16).

## **2.4. Mesane Karsinomları**

### **2.4.1. Epidemiyoloji**

Dünyada görülen kanserlerin %3,2'sini mesane karsinomları oluşturmaktadır olup en sık 6. kanserdir (17). Sadece erkekler dikkate alındığında 4. sırada yer alırlar ve erkeklerde kanser ilişkili ölümlerin 8. en sık nedenini oluştururlar (18). Türkiye'de ise erkeklerde görülen en sık 3. kanserdir ve görülme oranı %7,6'dır (19). Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya gibi endüstrileşmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre sıklığı 6 kat fazladır (20). Mesane kanserleri her yaşta görülürler. Ancak genel olarak hastalık orta yaş ve daha ileri yaşlarda ortaya çıkar, ürotelyal karsinom tanısı alma yaşı erkeklerde ortalama 69, kadınlarda 71'dir. Mortalite yaşlı insanlarda yüksektir. Mesane kanserleri etnik olarak farklılıklar göstermektedir. Amerika'da yaşayan beyazlarda her 100,000 de 17,7 iken siyah ırkda bu oran 9,2, Asyalılar da 7,5, Hintlilerde 2,6 dır (20).

#### **2.4.2. Etyoloji ve Risk Faktörleri**

Ürotelyumun kan ve idrar arasında geçirgenlik bariyeri teşkil etmesi nedeniyle epitel sürekli olarak çeşitli potansiyel karsinojenlere maruz kalmaktadır. Bu nedenle ürotelyal kanserlerin sık olması şaşırtıcı değildir. Bu kanserler ile güçlü ilişkisi tespit edilen risk faktörleri arasında sigara kullanımı, aromatik aminlere maruziyet, arsenik içeren suların tüketimi, kronik şistozoma enfeksiyonu, pelvik bölgeye uygulanan radyasyon tedavisi ve alkilleyici ajanların kullanımı yer almaktadır (21).

Sigara kullanan kişilerde mesane kanseri riski kullanmayan kişilere göre 2-6 kat artmış olup, sigara kullanım süresi ve kullanım miktarı ile bu risk artmaktadır (22). Sigara kullanımı bırakıldıktan sonra ise kanser riski giderek azalır ve 15 yıl sonunda risk hiç sigara kullanmayan bir kişi ile aynı olur (23). Etyolojik ajanlar arasında mesane kanserlerinin ikinci en sık nedeni mesleki aromatik amin maruziyetidir (24). Takip eden araştırmalarda boya sanayinde kullanılan aromatik aminlerden benzidin ve 2-naftilamin ile muhtemel 1-naftilamin karsinojen olarak tanımlanmıştır (25).

Kahve ve çay tüketimi bazı çalışmalarda mesane kanseri oluşumundan sorumlu tutulmuştur (26). Sakkarin gibi yapay tatlandırıcıların kullanımı ile mesane kanseri riskinde artış arasında anlamlı bir ilişki gösterilememiştir (26). Diyetin mesane kanseri gelişiminde rolü olabileceği düşünülmektedir (27). Fenasetin (anilin boyalarına kimyasal yapı açısından benzerlik gösterir) analjezik preparatlarından çok miktarda tüketmek 5-10 yıllık bir periyod içinde renal pelvis ve mesane ürotelyal karsinomları ile ilişkilendirilmiştir (26).

#### **2.4.3. Moleküler ve Genetik Özellikler**

Ürotelyal karsinomlarda birçok kromozomal değişim belirtilmiştir. 9. kromozomun total veya parsiyel kaybı özellikle yüzeyel tümörlerde bulunmuştur. Mesane tümörlerinde bunun yanında 17p,13q, 11p ve 14q kromozomlarında sıklıkla delesyonlar izlenmektedir. P53 overekspresyonu ürotelyal karsinomların büyük bir bölümünde özellikle de yüksek derecelilerde görülmekte olup prognoz ile ilişkilidir. Yapılan bazı çalışmalarda kromozom anomalilerinin histolojik derecesi yüksek mesane tümörlerinde daha sık görüldüğünü bildirilmiştir (10, 28-31). FHIT (frajil histidin triadı - 3p14.2 yerlesimli bir tümör supresör geni) azalması veya yokluğu

immünohistokimyasal analizlerle ürotelyal karsinomların %60'ında, özellikle ileri evre tümörlerde görülmüştür (10). Ürotelyal karsinomlarda sıkça silinen bir diğer gen de INK4A'dır. Bu gen Rb ve p53 yolaklarını regüle eden p16 ile p19 proteinlerini kodlar ve 9p21 kromozomunda bulunur (10).

#### **2.4.4. WHO 2004 Ürotelyal Tümörlerin Histolojik Klasifikasyonu**

##### **İnvaziv Olmayan Ürotelyal Neoplaziler**

Ürotelyal in situ karsinom

İnvaziv olmayan papiller ürotelyal karsinom, yüksek dereceli

İnvaziv olmayan papiller ürotelyal karsinom, düşük dereceli

Malignite potansiyeli düşük invaziv olmayan ürotelyal tümör

Ürotelyal papillom

Inverted ürotelyal papillom

##### **İnfiltratif Ürotelyal Karsinom**

- Squamöz diferansiasyon gösteren
- Glandüler diferansiyasyon gösteren
- Trofoblastik diferansiyasyon gösteren

Nested varyant

Mikrokistik varyant

Lenfoepitelyoma-benzeri varyant

Lenfoma-benzeri varyant

Plazmositoid varyant

Sarkomatoid varyant

Dev hücreli varyant

Andiferansiye varyant

#### **2.4.5. WHO/2004 Ürotelyal Karsinomlarda TNM klasifikasyonu (10)**

##### **T- Primer tümör**

Tx: Primer tümör bulunamadı

T0: Primer tümör yok

Ta: İnvaziv olmayan papiller karsinom

Tis: İn situ Karsinom

T1: Tümör epitel altı bağ dokusuna invaze

T2: Tümör kas tabakasına invaze

T2a: Tümör yüzeysel kas tabakasına invaze (iç yarısında)

T2b: Tümör derin düz kas tabakasına invaze

T3: Tümör perivezikal yağ dokusuna invaze

T3a: Mikroskopik olarak tespit ediliyor

T3b: Makroskopik olarak tespit ediliyor (mesane dışında kitle)

T4: Tümör prostat, uterus, vajina, pelvik duvar, abdominal duvara invaze

T4a: Tümör komşu organlara invaze (prostat, uterus veya vajina)

T4b: Tümör pelvik duvar veya abdominal duvara invaze

##### **N- Bölgesel lenf nodu**

Nx: Lenf nodu bilinmiyor

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1: Tek lenf nodunda metastaz var ( $\leq 2$ cm)

N2: Metastaz tek lenf nodunda (2-5 cm) metastaz var veya birçok lenf nodunda ama  $< 5$ cm

N3: Lenf nodunda metastaz var,  $\text{çap} > 5$ cm

##### **M- Uzak metastaz**

MX: Uzak metastaz bilinmiyor

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metasataz pozitif

#### **2.4.6. Ürotelyal Tümörlerin Histopatolojik Özellikleri ve Derecelendirme**

Ürotelyal tümörler için ilk olarak 1922’de Broder’in yaptığı sitolojik anaplazi ve yapısal özellikleri esas alan derecelendirme sistemi önerilmiştir. Günümüze kadar değişik histolojik derecelendirme sistemleri kullanılmakla birlikte, 1998 yılında o ana kadar kullanılan çeşitli sınıflama ve derecelendirme sistemlerinin yerini “World Health Organization ”(WHO) ve “International Society of Urological Pathology” (ISUP) organizasyonlarının oluşturdukları yeni bir sınıflandırma ve derecelendirme sistemi almıştır. Bu sınıflamaya göre epitelyal anormallikler anaplazi kanıtı olarak kabul edilmiştir. Bunlar; selülaritede artış, nükleer kalabalıklaşma, hücresel polaritede kayıp, bazaldan yüzeye doğru matürasyonda kayıp, pleomorfizm, hücre boyutlarında artış, çekirdek kromatin paterninde ve şeklinde varyasyonlar, anormal mitoz ve dev hücreleri içermektedir. Yukarıda tarif edilen anaplazi kriterleri varlığında, net invazyon olmasa da, “karsinom” tanısı verilmelidir.

1998, 2002 ve 2004 yılında yapılan küçük değişikliklerle halen kullanılan WHO 2004 sınıflandırma ve derecelendirme sistemi ortaya çıkmıştır. WHO/ISUP sınıflamasında ürotelyal neoplazmlar flat ve papiller lezyonlar olarak iki sınıfa ayrılmıştır. Papiller neoplazmlar ise histolojik derecesi ve invazyon özelliğine göre; papilloma, düşük malignite potansiyelli papiller ürotelyal neoplazm, düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom ve yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom olarak sınıflandırılmıştır (Tablo 2.1). 2004 WHO sınıflamasında invazyon göstermeyen (pTa) ürotelyal papiller neoplazilerin isimlendirmesinde düşük dereceli ve yüksek dereceli kanserlerin başına “non-invaziv” terimi getirilerek invaziv tümörler ile aralarındaki biyolojik davranış farklılığına dikkat çekilmiştir (32-35).

**Tablo 2.1: WHO/ISUP Papiller ürotelyal tümörlerin derecelenmesi**

|                                                         |
|---------------------------------------------------------|
| Ürotelyal Papillom                                      |
| Düşük malignite potansiyelli papiller neoplazm (PUNLMP) |
| Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom              |
| Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom             |

#### **2.4.7. Düşük Dereceli Non-İnvaziv Papiller Ürotelyal Karsinom**

Dallanma ve minimal füzyon gösteren silindirik papiller yapılar ile karakterize tümördür. Küçük büyütmelerde hücresel özelliklerdeki değişiklikler kolayca göze çarpar. Bu lezyonlar düzenli yapıya sahiptir. Çekirdekler üniform büyümüşdür, şekil, kontür ve kromatin dağılımlarında orta derecede farklılıklar vardır. Nükleolus olabilir, genellikle belirsizdir. Mitoz enderdir, daha çok bazalde izlenmekle birlikte herhangi bir seviyede de görülebilir (36).

#### **2.4.8. Yüksek Dereceli Non-İnvaziv Papiller Ürotelyal Karsinom**

Sıklıkla papillalarda birleşme ve dallanma izlenen tümörlerdir. Küçük büyütmelerde bile düzensiz patern ile yapısal ve hücresel özelliklerdeki değişiklikler kolaylıkla seçilebilmektedir. Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinomların aksine nükleer polarite, boyut, şekil ve kromatin dağılımındaki varyasyonlar şiddetlidir. Nükleuslarda irregüler kromatin dağılımı orta ve şiddetli düzeyde boyut farklılıkları ile ortaya çıkan pleomorfizm vardır. Nükleoluslar belirgindir. Mitotik aktivite sıktır, mitoz yüzey dahil olmak üzere herhangi bir seviyede izlenebilir, atipik mitoz görülebilir. Ürotelyumun kalınlığı değişken olabilir ve hücreler arasında sıklıkla diskohezyon gözlenir (36).

#### **2.4.9. İnfiltratif Ürotelyal Karsinom**

Mesane tümörleri sistoskopi, TUR, görüntüleme çalışmaları ve histopatolojik bulgulara göre, yüzeysel (Tis, Ta) veya infiltratif (T1, T2, T3, T4) olarak sınıflandırılır. İnfiltratif ürotelyal karsinomların histopatolojik değerlendirmesinde en önemli parametre invazyonun varlığı ve derinliğidir. Patolojik evre önemli prognostik faktördür. Ancak invazyon olguların yaklaşık %40'ında hatalı olarak değerlendirilmektedir (33).

**Lamina propria invazyonu:** Koter artefaktı, önceki biyopsi veya intravezikal tedavinin neden olduğu anatomik sınırın ortadan kalkması biyopsi örneğinin patoloji laboratuvarında hazırlanması esnasındaki teknik problemler, tanjansiyel kesitler lamina propria invazyonunun değerlendirilmesinde güçlüklerle neden olabilir. Gerçek lamina propria invazyonu “inverted” büyüme paterni ile karıştırılmamalıdır.

Genel olarak geniş tabanlı, düzgün sınırlı epitelyal uzantılar ‘‘inverted’’ büyüme paterni lehine iken, irili ufaklı, çevresinde retraksiyon artefaktı veya desmoplastik stroma bulunan, eozinofilik sitoplazmalı düzensiz sınırlı hücre kümeleri gerçek invazyon bulgularıdır (33-37).

**Kas invazyonu:** Muskularis propria (detrüsör kas) invazyonunu (pT2) değerlendirirken; muskularis mukozadaki kas liflerini muskularis propriadaki liflerden ayırmak gerekir. Muskularis mukoza lifleri devamlılık göstermeyen küçük demetler şeklindedir; ayrıca bu bölgede çok sayıda kan damarının varlığı muskularis propriadan ayırımında önemli bir ipucudur. Muskularis propria lifleri gevşek anastomozlaşan içte ve dışta longitudinal kas lifleri ile ortada kalın sirküler kas liflerinden oluşur. Transüretal rezeksiyon materyalinde derin ve yüzeysel muskularis propria invazyonu ayırt edilemez. Yağ dokusu içinde tümör hücrelerinin varlığı mutlaka perivezikal infiltrasyonun kanıtı değildir. Çünkü lamina priada da yağ dokusu mevcuttur (37).

#### **2.4.10. Düşük Dereceli İnvaziv Papiller Ürotelyal Karsinom**

Hemen daima papiller ve genellikle yüzeysel tümörlerdir (pT1). Yüzeysel tümörler ürotelyal tümörlerin %75-85’ini oluşturlar (38, 39).

**Histopatolojik incelemede;** küçük büyütmelerde düzenli gelişim gösteren papiller yapılar ve kolayca tanınabilen düşük düzeyde atipi mevcuttur. Hücreler arasında kohezyon ve polarite kaybı minimaldir. Hücreler genellikle üniform, nükleuslarda büyüme ve hafif pleomorfizm vardır. Aralarda neoplastik hücrelerde hiperkromazi görülebilir, nükleol belirgin olabilir ancak oldukça küçüktür. Mitoz seyrek her seviyede görülebilir ancak sıklıkla epitelin alt 1/3 kısmındadır. Nekroz nadirdir.

Düşük dereceli tümörlerde kas invazyonu ve yüksek dereceli tümörlere progresyon %5’ten azdır (37, 38).

#### **2.4.11. Yüksek Dereceli İnvaziv Ürotelyal Karsinom**

Sıklıkla kas invazyonu gösterirler

**Histopatolojik incelemede;** genellikle solid yapılar oluşturlar. Ancak değişen oranlarda papiller yapılar içerebilirler ya da pür papiller yapılar gösteren

tümörler yüksek dereceli sitolojik özelliklere sahip olabilirler. Papiller yapılarda sık dallanma ve füzyon mevcuttur. Tümör hücrelerinde belirgin polarite ve kohezyon kaybı görülmektedir. Hücrelerde orta veya yüksek düzeyde atipi, belirgin pleomorfizm, nükleuslarda irileşme ve kalabalıklaşma, hiperkomazi, nükleol belirginliği ve tümör dev hücreleri görülmektedir. Mitoz sık, epitelin her seviyesinde mevcuttur, atipik mitozlar izlenir. Nekroz vardır. Desmoplastik stromal reaksiyon ve lenfositik infiltrasyon belirgindir. Farklı diferansiyasyon alanları eşlik edebilir. (32, 33, 40).

## **2.5. Prognostik Faktörler**

**1-Evre:** En önemli prognostik göstergedir (10).

**2-Lenf Nodu Tutulumu:** Evrelendirme şeması lenf nodu tutulumunu içermektedir ve kötü prognoz işaretidir. Bu hastalarda özellikle de birkaç lenf nodu tutulumu varsa, uzun süreli sağkalım oranı % 0'a yakındır (10).

**3-Histolojik derece:** Evre ile ilişkilidir. Grade I ve Grade II tümörlerin çoğu yüzeysel olup, Grade III ve Grade IV tümörler derin invazyon yaparlar. (10). Tümör histolojik derecesi kasa invaziv karsinoma ilerlemede en önemli prognostik biyolojik göstergedir.

**4-Histolojik Tip:** Ürotelyal karsinomlarda glandüler veya skuamöz diferansiyasyonun prognostik önemi bilinmemektedir. Pür adenokarsinom veya skuamöz hücreli karsinomlar yüksek evreli olmaya meyillidirler ve prognozları ürotelyal karsinomlarla benzerdir. Ürotelyal karsinomun diğer varyantları mikropapiller ürotelyal karsinom, sarkomatoid karsinom ve küçük hücreli karsinom kötü prognozludur.

**5-Hasta Yaşı:** Hayatın ilk iki dekatında görülen tümörler genellikle iyi diferansiye, invazyon yapmayan ve çok iyi prognoza sahip tümörlerdir (10). Bir çalışmada 40 yaşın altındaki hastalarda daha az patolojik agresiflik saptanmıştır (41).

**6-Tümör Lokalizasyonu:** Mesane boynundaki tümörler daha kötü prognoz ile ilişkilidir. Mesane kubbesindeki tümörler yüksek grade'li olma eğiliminde iken; lateral duvar ve üreter orifis tümörlerinin düşük grade'li olma eğilimleri vardır (10). Mesanede multifokal tümör bulunması ve ürotelyal traktda (üreter ve üretra) tümör

bulunması halinde rekürrens, progresyon ve ölüm riski artmıştır. Prostat ve seminal veziküllerin tutulumu kötü prognozla ilişkilidir.

**7-Mesane Mukozasındaki Anormallikler:** Ana tümör kitlesinden uzaktaki, küçük tümör odakları veya displastik değişiklikler yüksek rekkürens oranı ile ilişkilidir (10).

**8-Ürotelyal karsinoma in situ:** Rekürrens ve progresyon riskini arttıran önemli kötü prognostik bir bulgudur (10).

**9-Vasküler İnvazyon:** Lenf damarı ya da kan damarı invazyonu yüksek rekkürens ile ilişkili bulunmuştur (10).

**10-Cerrahi Sınırların Durumu:** Lokal rekürrens için başlıca prognostik parametredir.

**11-Tümörü İnfiltrate Eden Lenfositler:** Tümörü infiltrate eden lenfositlerin yoğunluğu tümör grade'i ve Ta-T1 olan tümörlerde progresyon ile ilişkili olarak bulunmuştur, ancak bu ilişki çok değişkenli analizler ile gösterilememiştir (10).

**12-Tümör Boyutu:** Evre II tümörlerde, tümör boyutu metastaz riski ve derin kas invazyonu açısından daha iyi bir göstergedir (10). Tümör boyutu tümör invazivliğini etkiler. Bir çalışmada tümör boyutu 5 cm baz alınarak ayrılmış ve bunlarda muskularis propria invazyonu bakıldığında 5 cm'den büyük olan tümörlerde invazyon oranı 4 kat fazla bulunmuştur (42).

**13-Kan Grubu Antijenleri:** ABH ve Lewis kan grubu antijenleri (Lea, Leb ve Ley) normal ürotelyum yüzeyinde vardır. Lewis X antijeni normal yetişkin ürotelyumunda yoktur, bazen şemsiye hücrelerinde görülebilir. Ürotelyal hücrelerde malign transformasyon görülmesi, ABH kan grubu antijenlerinin kaybı ve yükselen Lewis X (Lex) antijen ekspresyonu ile ilişkilidir. Bununla beraber ABH antijen delesyonu yüksek rekkürens oranı ve invaziv mesane tümörü gelişimi ile koreledir (43-45).

**14-DNA Ploidi:** Selüler DNA'nın ölçümü idrarda flow sitometri veya statik tekniklerle yapılmaktadır. Anaploid hücre populasyonları yüksek grade karsinom veya in situ karsinom varlığında tespit edilmektedir. Diploid tümörler genellikle düşük grade ve düşük evrede olma eğilimindedir ve daha iyi prognozludur. Flow sitometri ile özellikle karsinoma in situ veya yüksek gradeli malignitesi olan

hastalarda %80-90 oranında doğru sonuç alınır. DNA ploidi ile mikroskopik grade ve klinik gidiş arasında yüksek korelasyon gözlenmiştir (46-49).

**15-Hücre Proliferasyonu:** Yüksek proliferatif indeks tümör progresyonu ile pozitif korelasyon göstermektedir (10, 50, 52).

**16-Kromozomal Aberasyonlar:** Y kromozomu kaybı veya 1. ve 17. genlerin polizomisi gibi bazı karyotipik sapmaların yüksek progresyon ile korele olduğu söylenmektedir (10).

**17-p53:** P53 gen mutasyonu mesane tümörleri de dahil olmak üzere insan tümörlerinde en sık görülen defektir (53). Normal p53 protein kaybının yada mutasyonunun neoplastik hücre büyümesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (54). Mutant p53 ekspresyonun mesane kanserinde erken invazyon ve metastaz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (55). T1 ve T2a mesane karsinomlarında p53 overekspresyonu progresyon ile istatistiksel olarak yüksek korele bulunmuştur (10).

## **2.6. Hücre Siklusu**

### **2.6.1 Hücre Siklusu ve Hücre Replikasyonunun Düzenlenmesi**

DNA replikasyonunu ve bölünmesini başarmak için hücre, siklus olarak bilinen çok kontrollü zincirleme olaylardan geçer. Hücre siklusu G1 (presentetik), S (DNA sentezi), G2 (premitotik), M (mitoz) fazlarını içerir. Her hücre siklus fazı, bir öncekinin uygun şekilde aktivasyonuna ve tamamlanmasına bağlıdır. G1, S, G2 bir arada interfaz olarak da adlandırılır. Kültürde çoğalan tipik bir insan hücresinde, 24 saatlik döngünün 23 saatini interfaz ve 1 saatini de M evresi oluşturur. Hücre siklusunun özellikle G1 ve S fazları arasındaki geçişte çok sayıda kontroller ve aşırı tekrarlar vardır. Bu kontroller hem aktivatörleri hemde inhibitörleri, hatta denetim noktası mekanizmalarını içerir.

Siklusa girmek için durağan hücreler önce hücre siklusuna giriş kapısı gibi görev yapan, ilk karar aşaması Go (istirahat fazı) dan G1'e geçiş yapmalıdır. G1'e giren hücrelerin siklus boyunca ilerlemeleri siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK'lar) ve bunların inhibitörleriyle yönetilir. CDK'lar tüm hücre siklusu boyunca inaktif formda eksprese olurlar. Siklinler adı verilen protein ailesine bağlanarak fosforile olduktan sonra aktif forma geçerler. CDK'ların aksine siklinler, hücre siklusunun spesifik evrelerinde sentezlenir ve fonksiyonları CDK'ları aktive

etmektedir. 15'ten fazla siklin tanımlanmıştır. Sırasıyla siklin D, E, A ve B hücre siklusunda görülürler ve bir veya daha fazla CDK'ya bağlanırlar ( 56).

### **2.6.2. Siklin D ve Rb Fosforilasyonu**

Siklin D hücre siklusunda artan ilk siklin olup G1 fazının ortasında görülür. Siklin D'nin üç formu D1, D2 ve D3 ismini alır. Hücre siklusunun G1 fazında siklin D, CDK4'ü aktive eder ve “ siklin D-CDK4” kompleksini oluşturur. Bu kompleks retinoblastoma duyarlılık proteinini (Rb) fosforile ederek hücre siklusunda kritik bir rol oynar. İnsan kanserlerinde tanımlanan ilk tümör baskılayıcı gen Rb'dir. 13q14 üzerinde lokalize olan Rb geni hücre siklusunun negatif düzenleyicisi görevini gören nükleer pRb'yi kodlamaktadır. Hipofosforile durumda iken Rb, transkripsiyon faktörü E2F ile sıkı bir inaktif kompleks oluşturarak hücre replikasyonunu önler. Dinlenme halindeki hücreler büyüme faktörleriyle uyarıldığında siklin D ve siklin E konsantrasyonları yükselerek, G1/S kısıtlama noktasında siklin D-CDK4 ve siklin E-CDK2 aktivasyonuna ve Rb'nin fosforilasyonuna yol açar. Rb fosforilasyonu hücre siklusu için moleküler bir “açma-kapama” düğmesidir, hücre siklusunun ilerlemesindeki ana engeli ortadan kaldırır ve hücre replikasyonunu uyarır. Hiperfosforile Rb, kompleksden ayrılarak S fazına geçiş için gerekli olan E2F hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive eder. M fazında hücresel fosfotazlar ile fosfat grupları Rb'den ayrılır ve hipofosforile Rb oluşur (56).

### **2.6.3. G1/S Kısıtlama Noktasından Öteye Hücre Siklusunun İlerlemesi**

S fazında ilerleme ve DNA replikasyonunun başlaması, siklin E ve CDK2 arasındaki aktif kompleks oluşumuyla gerçekleşir. Bu seviyedeki siklin salınımını etkileyen bir mutasyon, hücrelerin kolayca S fazına geçişine olanak sağlar (50, 51). Aktive E2F, DNA replikasyonu için gerekli olan siklin E ve polimeraz transkripsiyonunu arttırarak DNA sentezini uyarır.

Hücre siklusunda diğer karar noktası G2/M geçişidir. Bu geçişi mitotik profazdaki olayları düzenleyen A-CDK2 kompleksini oluşturan E2F aracılı siklin A transkripsiyonu başlatır. Hücreyi profazın ilerisine iten ana medyatör olan siklin B-CDK1 kompleksi bir protein fosfataz (cdc 25) ile aktive olur ve erken profazda hücrede birikmeye başlar. Siklin B-CDK1 aktivasyonu nükleer zarfın yıkılmasına yol

açarak mitozu başlatır. Mitozdan çıkış siklin B-CDK1 'in inaktivasyonunu gerektirir. Yeni bölünen hücreler daha sonra G1'e dönebilir, yeni bir replikatif sıklusa başlayabilirler veya dinlenmeye geçebilirler. Siklin E'nin her iki izoformunda yokluğu (E1, E2), dinlenmede olan hücrelerin hücre siklusuna girmesini önler (56).

#### **2.6.4. Hücre Siklusu İnhibitörleri**

Siklin-CDK komplekslerinin aktivitesi, CDK inhibitörleri adı verilen inhibitörler ile sıkı bir şekilde kontrol edilir. CDK inhibitörleri iki ana sınıfa ayrılır: Cip/Kip ve INK4/ARF aileleri. Bu inhibitörler tümör supresör olarak fonksiyon görürler ve sıklıkla tümörlerde değişikliğe uğrarlar. Cip/Kip ailesi p21, p27 ve p57 olarak bilinir. Bunlar CDK 2, 4 ve 6'nın siklin A, D ve E ile yaptıkları komplekslere bağlanarak G1 ve S evreleri boyunca ilerlemenin tüm basamaklarını denetlerler.

INK4 ailesinin üyeleri p15, p16, p18 ve p19'dur. Bunlar özel olarak CDK4 ve CDK6'ya bağlanır ve inhibe ederler, yani INK4/ARF G1'deki restriksiyon noktasından geçişi inhibe ederler (57, 58).

#### **2.6.5. Hücre Siklusunda Kontrol Noktaları**

Hücre siklusunda bir kaç kontrol mevcuttur. Bu kontrol noktaları, replike olmamış ya da hasarlı DNA'lara duyarlıdır ve DNA replikasyonunun tamamlanması ya da onarımı ile, hücre döngüsünü ayarlar. Birçok hücrede bu türden 2 kontrol noktası vardır. Biri G1 kontrol noktasıdır ve S fazına geçişi engeller, diğeri geç G2 fazında olup mitozu girişi engeller.

Memeli hücrelerinde G1 kontrol noktasındaki duraksama, p53'ün etkisi ile gelişir. Transkripsiyonel düzenleyici olarak fonksiyon gören p53 proteini, CDK inhibitörü p21'in ekspresyonunu uyarır. p21 proteini birçok CDK/siklin kompleksini inhibe eder (59). G2 kontrol noktasında hasarlı DNA etkisini Cdc25 üzerinden gösterir. Cdc25 bir fosfataz olup, CDK'nın defosforilasyonunu, dolayısıyla aktivasyonunu katalizler, hücre siklus progresyonunu sağlar.

#### **2.7. Ki 67 Proliferasyon İndeksi**

Ki-67, prognoz belirlemede kesin sonuçlar vermese de, proliferasyon markırı olarak kullanılmaktadır. Ki-67, hücre siklusunda proliferen olan hücreleri

belirleyen bir antikordur. “Proliferasyon veya Labelling index”, ki-67 pozitif olan hücrelerin çekirdeklerinin sayılmasıyla ortaya konulur, boyanma gösteren hücrelerin, tüm tümör hücrelerinin sayısına oranı olarak ifade edilir (60).

Bazı çalışmalarda, özellikle düşük dereceli tümörlerde, progresyonu ön görmede yüksek mitotik aktivitenin bağımsız risk faktörü olduğu gösterilmiştir (50, 59-63).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Olgu Seçimi**

Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2004-2013 yılları arasında mesane karsinomu tanısı verilmiş hastalara ait TUR ve sistektomi materyallerine ait parafin bloklar ve raporlar arşivimizden çıkarılarak incelendi. Bunlar içerisinde ürotelyal karsinom tanısı verilmiş uygun ve yeterli dokusu bulunan 86 hasta çalışmaya dahil edildi. Olgular WHO/ISUP 2004 kriterlerine göre yeniden değerlendirildi.

#### **3.2. İmmünohistokimyasal İnceleme**

86 olguya ait H&E preparatları incelenerek en uygun 1 adet parafin blok seçildi. Seçilen parafin bloklara siklin D1, siklin E1, E2F1, RB, p27 ve ki-67 immünohistokimyasal çalışılmak üzere her olgu için 6 adet 3 mikron kalınlığında kesitler yapılarak Poly-L-Lysine lamlara alındı. Kullanılan antikorların özellikleri Tablo 3.1'de verilmiştir. Dilüsyonlar ve optimum boyama tekniği uygun pozitif ve negatif kontroller kullanılarak ayarlandı. Kontrol dokusu olarak siklin D1 ve siklin E1 için meme karsinomu, Rb, E2F1 ve p27 için kolon karsinomu, Ki-67 için tonsil dokusu kullanıldı. Üretici firmanın önerileri göz önüne alınarak antikorlar dilüe edildi. Otomatik immünohistokimya boyama cihazı ile standart immünohistokimyasal boyama tekniği uygulandı: Özetle, deparafinizasyon, dehidratasyon, endojen peroksidaz inaktivasyonu ve antikorlar için uygun antijen açığa çıkarma yöntemleri sonrasında kesitler yarım saat oda ısısında primer antikor ile inkübe edildi. Ardından camlara biotinlenmiş sekonder antikor ve sonra streptavidin konjuge horseradish peroksidaz uygulandı ve diaminobenzidin kromojeni ile işaretleme gerçekleştirildi.

**Tablo 3.1: Kullanılan antikorların özellikleri**

| Antikor   | Üretici firma | Klon     | Dilüsyon | Antijen açığa çıkarma |
|-----------|---------------|----------|----------|-----------------------|
| Siklin D1 | Leica         | P2D11F11 | -        | EDTA                  |
| Siklin E1 | Thermo        | 13A3     | 1/100    | EDTA                  |
| E2F1      | Abcam         | KH95     | 1/30     | Sitrat                |
| Rb        | Thermo        | 1F8      | 1/125    | Sitrat                |
| p27       | Thermo        |          | 1/125    | Sitrat                |
| Ki-67     | Leica         | MM1      | 1/200    | Sitrat                |

### 3.3. İmmunreaktivitenin Değerlendirilmesi

İmmunohistokimyasal ekspresyon değerlendirilmesinde ışık mikroskopunda x200 büyütmede her bir antikor için nükleer boyanma paterni göz önüne alındı. Değerlendirme boyanma şiddeti ve yaygınlığı esas alınarak yapıldı. İstatistiksel çalışmalarda boyanma yaygınlığı ve şiddetine göre elde edilen veriler ayrı ayrı olarak, ayrıca yaygınlık ve şiddet değerlerinin toplamından elde edilen immünreaktif skor kullanıldı. Böylece iki farklı yöntemle elde edilen sonuçlar kıyaslandı.

Boyanma şiddeti bütün antikorlar için: 0 (Boyanma yok), 1 (zayıf), 2 (orta derecede), 3 (kuvvetli) olarak değerlendirildi.

#### **Siklin D1, Siklin E1, E2F1, Ki-67 boyanma yaygınlığının değerlendirilmesi:**

- 0: Hücre boyanmasının olmaması
- 1: <% 25 tümör hücre boyanması
- 2: %25-50 tümör hücre boyanması
- 3: %51-75 tümör hücre boyanması
- 4: >%75 tümör hücre boyanması

**Rb ve p27 boyanma yaygınlığının değerlendirilmesi:**

- 0: Hücre boyanmasının olmaması
- 1: <% 25 tümör hücre boyanması
- 2: %25-50 tümör hücre boyanması
- 3: >%50 tümör hücre boyanması

**3.4. İstatistiksel Değerlendirme**

Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların yanı sıra yaş dağılımının değerlendirilmesi Student's T testi ile yapıldı. İmmünohistokimyasal verilerin prognostik faktörlerle karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. İmmünohistokimyasal markırların boyanma şiddeti yaygınlığı ve immünreaktif skorlarının korelasyon hesaplamasında Kendall Tau testi kullanıldı. Korelasyonda anlamlılık  $r=0-0,25$  çok zayıf,  $r>0,25-0,50$  zayıf,  $r>0,50-0,75$  orta,  $r>0,75$  yüksek korelasyon, olarak değerlendirildi.  $P<0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Klinik ve Patolojik Bulgular

2004-2013 yılları arasında Abant izzet Baysal Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü'nde ürotelyal karsinom tanısı almış 22 adet radikal sistektomi piyesi ve 64 adet transüretral rezeksiyon (TUR) materyali olmak üzere toplam 86 hasta çalışma grubumuzu oluşturmuştur.

Olguların yaşları 46 ile 88 arasında değişmekte olup ortalama yaş 66 ( $\pm 10,3$ )'dır. Çalışmada erkek olgu sayısı 78 (%90,7); kadın olgu sayısı 8 (%9,3)'dir. Olgulardan 45 tanesi (%52,3) yüksek dereceli ürotelyal karsinom, 41 tanesi (%47,7) düşük dereceli ürotelyal karsinom, 57 tanesi (%66,3) pT1, 22 tanesi (%25,6) pT2, 5 tanesi (%5,8) pT3, 2 tanesi (%2,3) pT4'dür. pT3 ve pT4 grubundaki hasta sayısı oldukça düşüktür. İstatistiksel karşılaştırmalarda olgular lamina propria invazyonu gösteren (pT1) ve kas invazyonu gösteren (pT2+pT3+pT4) olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır.

Hastaların takip süresi 1-10 yıl arasında değişmektedir ve 57 si (%66,3) rekürrens göstermiş, 22'sinde (%25,6) rekürrens izlenmemiştir, 7 tanesi ise (%8,1) bilinmemektedir.

Yüksek dereceli ürotelyal karsinom tanılı 45 hastanın 31 tanesinde (%54,3), düşük dereceli ürotelyal karsinom tanılı 41 hastanın 26 tanesinde (%45,6) olmak üzere toplam 57 hastada (%66,2) rekürrens izlenmiştir. Rekürrens gösteren hastaların ortalama yaş aralığı 67,2'dir. Hastaların 5 tanesi kadın 52 tanesi erkektir.

24 hasta (%27,9) ilk tanı konulduğunda yüksek derece ve evre pT2'dir. İlk tanısı düşük dereceli ürotelyal karsinom olan hastaların 5 tanesinde (%7,9) yüksek dereceye progresyon izlenmiştir. Progresyon gösteren hastaların tamamı erkektir ve yaş ortalaması 65,2 ( $\pm 8,6$ )'dir.

Materyallerin 22 tanesi sistektomi olup bunların 7 tanesinde (%31,8) lenf nodu metastazı mevcuttur. TUR materyali bulunan hastaların lenf nodu metastazı hakkında klinik ve radyolojik bilgiye ulaşılamamıştır (Tablo 4.1-4.2). Lenf nodu metastazı bulunan hastaların 2 tanesi kadın, 5 tanesi erkektir ve yaş ortalaması 64,7 ( $\pm 8,7$ )'dir.

**Tablo 4.1: Klinik ve patolojik özellikler**

| <b>Materyaller</b>          | <b>N (%)</b>     |
|-----------------------------|------------------|
| Sistektomi                  | 22 (%25,6)       |
| TUR                         | 64 (%74,4)       |
| <b>Cinsiyet</b>             |                  |
| Kadın                       | 8 (%9,0)         |
| Erkek                       | 78 (%91,0)       |
| <b>Yaş</b>                  |                  |
| Min-max                     | 46-88            |
| Ortalama                    | 66 ( $\pm$ 10,3) |
| <b>Histolojik Derece</b>    |                  |
| Düşük dereceli              | 41 (%47,7)       |
| Yüksek dereceli             | 45 (%52,3)       |
| <b>Patolojik Evre</b>       |                  |
| T1                          | 57 (%66,3)       |
| T2                          | 22 (%25,6)       |
| T3                          | 5 (%5,8)         |
| T4                          | 2 (%2,3)         |
| <b>Rekürrens</b>            |                  |
| Var                         | 57 (%66,3)       |
| Yok                         | 22 (%25,6)       |
| Bilinmiyor                  | 7 (%8,1)         |
| <b>Progresyon</b>           |                  |
| Var                         | 5 (%8,1)         |
| Yok                         | 56 (%62,7)       |
| İlk tanısı yüksek derece    | 24(%27,9)        |
| Bilinmiyor                  | 1 (%1,2)         |
| <b>Lenf Nodu Metastazı*</b> |                  |
| Var                         | 7 (%31,8)        |
| Yok                         | 15 (%68,1)       |

\*Lenf nodu metastazı sadece sistektomili hastalarda değerlendirilmiştir.

**Tablo 4.2: Olguların tümör grade ve stage'ine göre dağılımı**

|                   | T1         | T2         | T3        | T4       |
|-------------------|------------|------------|-----------|----------|
| <b>Low Grade</b>  | 39 (%95,1) | 2 (%4,9)   | –         | –        |
| <b>High Grade</b> | 18 (%4,9)  | 20 (%44,4) | 5 (%11,1) | 2 (%4,4) |

#### **4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular**

Siklin D1, siklin E1, E2F1, Rb, p27 ve ki-67 boyanma şiddet, yaygınlık değerleri ile toplam immünreaktif skorları tablo 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 da verilmiştir. Bütün markırların boyanma yaygınlığı, şiddeti ve bu iki değer toplamı ile bulunmuş immünreaktif skorları Kendall's Tau yöntemi ile her bir markırın diğerleri ile olan korelasyonu incelenmiştir.

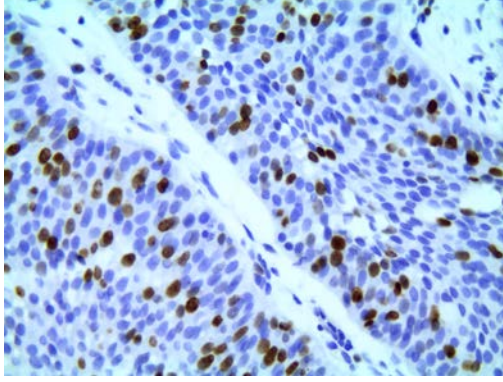
Siklin D1 boyanma yaygınlığı ile Rb boyanma yaygınlığı arasında zayıf pozitif korelasyon mevcuttur ( $r=0,241$ ,  $p=0,008$ ). Rb ve p27 tümör supresör genlerdir ve çalışmamızda Rb boyanma yaygınlığı ile p27 boyanma yaygınlığı arasında zayıf pozitif korelasyon olduğu dikkati çekmektedir ( $r=0,279$ ,  $p=0,002$ ). Rb ve E2F1 hücre siklusunda birbiri ile yakın ilişki halinde olmasına rağmen bizim çalışmamızda bu iki gen ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı değerlere tekabül eden korelasyon mevcut değildir.

E2F1 boyanma yaygınlığı ve şiddeti ile p27 yaygınlığı ve şiddeti arasında istatistiksel olarak zayıf pozitif korelasyon mevcuttur (boyanma yaygınlığı ve şiddeti sırasıyla:  $r=0,284$ ,  $p=0,048$  ve  $r=0,186$ ,  $p=0,048$ ).

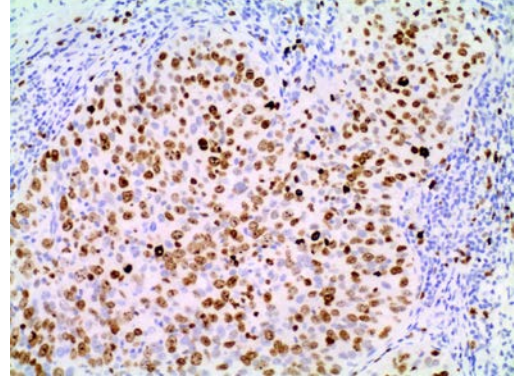
Siklin E1 şiddeti ve yaygınlığı ile p27 yaygınlığı ve şiddeti arasında da zayıf pozitif korelasyon mevcuttur (boyanma yaygınlığı ve şiddeti sırasıyla:  $r=0,248$ ,  $p=0,006$  ve  $r=0,241$ ,  $p=0,010$ ). Aynı şekilde E2F1 nin toplam immünreaktif skoru ile p27 ve siklin E1 toplam immünreaktif skorları arasında da pozitif korelasyon mevcuttur (sırası ile  $r=0,228$ ,  $p=0,008$ ,  $r=0,242$ ,  $p=0,005$  ve  $r=0,261$ ,  $p=0,002$  ).

Ki-67 ekspresyonu (Resim 1) ile diğer markırların korelasyonuna bakıldığında Ki-67 boyanma yaygınlık ve şiddeti ile E2F1 ve p27 yaygınlık ve şiddeti arasında istatistiksel olarak zayıf pozitif korelasyon olduğu görülmektedir (boyanma yaygınlığı ve şiddeti korelasyon değerleri sırasıyla:  $r=0,478$ ,  $p<0,0001$ ,

E2F1  $r=0,199$ ,  $p=0,032$ ,  $r=0,357$ ,  $p<0,0001$ ,  $r=0,325$ ,  $p<0,0001$ ). Ki-67 toplam immünreaktif skoru ile E2F1 ve p27 toplam immünreaktif skorları arasında da aynı şekilde zayıf pozitif korelasyon mevcuttur (sırası ile  $r=0,362$ ,  $p<0,0001$  ve  $r=0,278$ ,  $p<0,0001$ ).



A



B

**Resim 1:** (A) Düşük dereceli ürotelyal karsinomda skor 1 ( $\%<25$ ) ve (B) kas invazyonu mevcut, yüksek dereceli olguda skor 4 ( $\%>75$ ) nükleer Ki-67 ekspresyonu (x200 ve x400)

**Tablo 4.3-4.4: İmmünohistokimyasal markırların boyanma yaygınlığı**

|             | 0<br>n (%) | <%25<br>n (%) | %25-50<br>n (%) | >%50<br>n (%) |
|-------------|------------|---------------|-----------------|---------------|
| <b>Rb</b>   | 24 (%27,9) | 36 (%41,9)    | 21 (%24,4)      | 5 (%5,8)      |
| <b>E2F1</b> | 11(%12,8)  | 52 (%60,5)    | 21 (%24,4)      | 2 (%2,3)      |

|                  | 0<br>n (%) | <%25<br>n (%) | %25-50<br>n (%) | %51-75<br>n (%) | >%75<br>n (%) |
|------------------|------------|---------------|-----------------|-----------------|---------------|
| <b>Siklin D1</b> | 11 (%12,8) | 27 (%31,4)    | 21 (%24,4)      | 11 (%12,8)      | 16 (%18,6)    |
| <b>Siklin E1</b> | 11 (%12,8) | 38 (44,2)     | 20 (%23,3)      | 8 (%9,3)        | 9 (%10,5)     |
| <b>p27</b>       | 4 (%4,7)   | 15 (%17,4)    | 18 (%20,9)      | 20 (%23,3)      | 29 (%33,7)    |
| <b>Ki-67</b>     | 11 (%12,8) | 53 (%61,6)    | 16 (%18,6)      | 5 (%5,8)        | 1 (%1,2)      |

**Tablo 4.5: İmmünohistokimyasal markırların boyanma şiddeti**

|                  | <b>Negatif<br/>n (%)</b> | <b>Zayıf<br/>n (%)</b> | <b>Orta<br/>n (%)</b> | <b>Şiddetli<br/>n (%)</b> |
|------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------|---------------------------|
| <b>Siklin D1</b> | 11 (%12,8)               | 23 (%26,7)             | 23 (%26,7)            | 29 (%33,7)                |
| <b>Siklin E1</b> | 11 (%12,8)               | 37 (%43,0)             | 22 (%25,6)            | 16 (%18,6)                |
| <b>E2F1</b>      | 11 (%12,8)               | 26 (%30,2)             | 22 (%25,6)            | 27 (%31,4)                |
| <b>Rb</b>        | 24 (%27,9)               | 40 (%46,5)             | 18 (%20,9)            | 6 (%7,0)                  |
| <b>p27</b>       | 4 (%4,7)                 | 21 (%24,4)             | 16 (%18,6)            | 45 (%52,3)                |
| <b>Ki-67</b>     | 11(%12,8)                | 25 (%29,1)             | 25 (%29,1)            | 25 (%29,1)                |

**Tablo 4.6: İmmünohistokimyasal markırların immünreaktif skorları**

|                  | <b>0<br/>n(%)</b> | <b>2<br/>n (%)</b> | <b>3<br/>n (%)</b> | <b>4<br/>n (%)</b> | <b>5<br/>n (%)</b> | <b>6<br/>n (%)</b> | <b>7<br/>n (%)</b> |
|------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| <b>siklin D1</b> | 1<br>(%12,8)      | 23<br>(%26,7)      | 5<br>(%5,8)        | 14<br>(%16,3)      | 9<br>(%10,5)       | 7<br>(%8,1)        | 17<br>(%19,8)      |
| <b>siklin E1</b> | 11<br>(%12,8)     | 32<br>(%37,2)      | 11<br>(%12,8)      | 11<br>(%12,8)      | 9<br>(%10,5)       | 4<br>(%4,7)        | 8<br>(%9,3)        |
| <b>E2F1</b>      | 11<br>(%12,8)     | 26<br>(%30,2)      | 16<br>(%18,6)      | 18<br>(%20,9)      | 13<br>(%15,1)      | 2<br>(%2,3)        | -                  |
| <b>Rb</b>        | 24<br>(%27,9)     | 29<br>(%33,7)      | 12<br>(%14,0)      | 17<br>(%19,8)      | 2<br>(%2,3)        | 2<br>(%2,3)        | -                  |
| <b>p27</b>       | 4<br>(%4,7)       | 12<br>(%14,0)      | 8<br>(%9,3)        | 7<br>(%8,1)        | 12<br>(%14,0)      | 16<br>(%18,6)      | 27<br>(31,4)       |
| <b>Ki-67</b>     | 11<br>(%12,8)     | 22<br>(%25,6)      | 21<br>(%24,4)      | 17<br>(%19,8)      | 10<br>(%11,6)      | 4<br>(%4,7)        | 1<br>(%1,2)        |

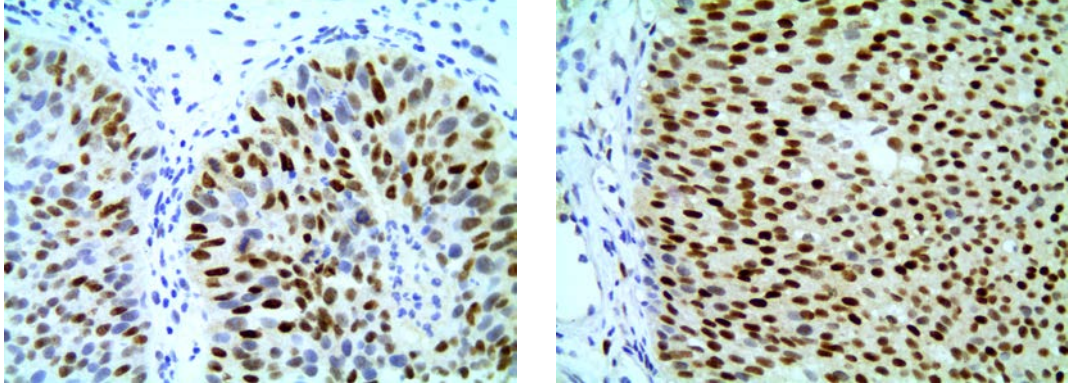
#### 4.2.1. Siklin D1

Nükleer siklin D1 ekspresyonu yüksek dereceli tümörlerin 36 tanesinde (%80) düşük dereceli tümörlerin 39 tanesinde (%95,1) izlendi (Resim 2). Düşük dereceli tümörlerde ortalama immünreaktif skor 3,83; yüksek dereceli tümörlerde 3,69'dur. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p=0,705$ ). Ancak boyanma yaygınlığı ve şiddetine ayrı ayrı bakıldığında; düşük dereceli tümörlerde siklin D1 ortalama boyanma yaygınlığı (2,12 ) ve şiddeti (2,37) yüksek dereceli olgulara göre (her iki ortalama değer 1,53) daha yüksektir. Bu sonuçlar istatistiksel olarak da anlamlıdır ve histolojik derece yükseldikçe siklin D1 ekspresyonunun azaldığı dikkati çekmektedir (  $p$  değerleri sırası ile  $p=0,011$  ve  $p=0,003$ ).

Siklin D1 ortalama immünreaktif skoru ile lamina propria invazyonu gösteren tümörler ya da kas invaziv tümörler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur ( $p=0,184$ ). Ancak yine boyanma yaygınlığı ve şiddetine göre bakıldığında pT1 tümörlerde ortalama boyanma yaygınlığı 2,25 boyanma şiddeti 2,07 iken; kas invaziv tümörlerde bu değerler 1,31'dir. Kas invazyonu gösteren tümörlerde siklin D1 ekspresyonunun daha düşük olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur (her ikisi için de  $p$  değeri  $p=0,001$ ).

Rekürrens gösteren olgularda siklin D1 boyanma yaygınlık ve şiddetinin daha düşük olduğu görülmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki mevcut değildir ( $p=0,521$ ,  $p=0,508$ ). Benzer şekilde progresyon gösteren ve lenf nodu metastazı olan olgularda siklin D1 ekspresyonu daha düşük izlense de bu sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p$  değeri sırası ile  $p=0,219$ ,  $p=0,134$  ve  $p=0,945$ ,  $p=0,581$ ).

Ki-67 proliferatif indeksi ile siklin D1 ekspresyonu arasında anlamlı bir korelasyon mevcut değildir ( $r=0,624$ ,  $p=0,86$ ).



A

B

**Resim 2: (A)** Düşük dereceli ürotelyal karsinomda skor 3 (%50-75) ve **(B)** kas invazyonu gösteren, yüksek dereceli ürotelyal karsinomlu olguda skor 4 (>%75) siklin D1 nükleer ekspresyonu görülmektedir (x 200).

#### 4.2.2. Siklin E1

Nükleer siklin E1 ekspresyonu yüksek dereceli tümörlerin 38 tanesinde (%84,4) düşük dereceli tümörlerin 37 tanesinde (%90,2) izlenmiştir (Resim 3). Düşük histolojik dereceli olgularda ortalama siklin E1 immünreaktif skoru 3,00 iken yüksek dereceli olgularda 3,18'dir. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p=0,521$ ). Boyanma yaygınlık ve şiddetine göre ayrıca bakıldığında da histolojik derece ile siklin E1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ( $p=0,196$ ,  $p=0,587$ ).

pT1 tümörlerde siklin E1 ortalama immünreaktif skoru 3,14; kas invaziv olgularda 3,00'dır. Kas invaziv tümörlerde siklin E1 ekspresyonu biraz daha düşük gibi görünse de patolojik evre ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki mevcut değildir ( $p=0,951$ ). Boyanma yaygınlığı ve şiddeti açısından bakıldığında da benzer şekilde anlamlı bir ilişki mevcut değildir ( $p=0,765$ ,  $p=0,211$ ).

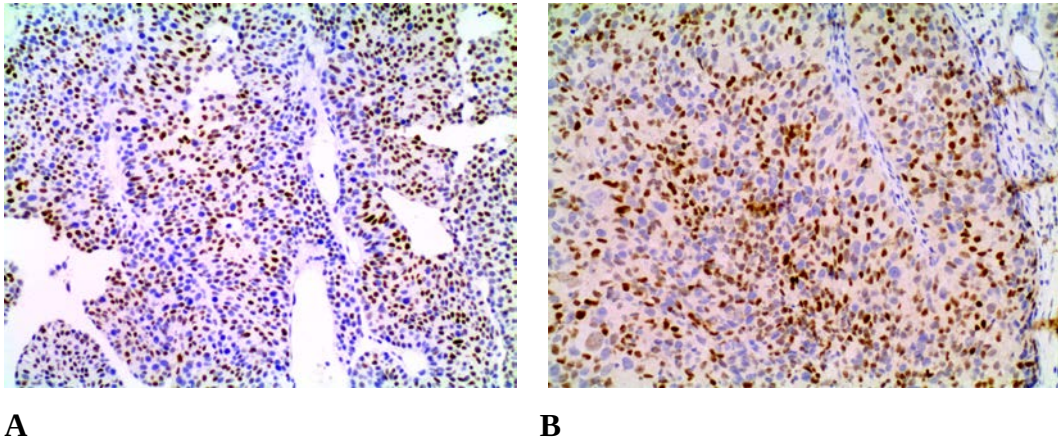
Rekürrens gösteren olgularda siklin E1 ortalama boyanma yaygınlık, şiddet ve immünreaktif skorunun daha düşük olduğu görülmüştür. Ancak bu verilerin hiç biri istatistiksel olarak anlamlı sonuca tekabül etmektedir ( $p$  değerleri sırası ile  $p=0,196$ ,  $p=0,587$ ,  $p=0,114$ ).

Progresyon gösteren olgularda siklin E1 ortalama immünreaktif skoru daha yüksektir ancak siklin E1 immünreaktif skoru, boyanma yaygınlığı ve şiddeti ile progresyon arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki mevcut değildir ( $p$  değerleri sırası ile  $p=0,085$ ,  $p=0,297$ ,  $p=0,789$ ).

Lenf nodu metastazı ile siklin E1 ekspresyonu arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki mevcut değildir (p değerleri sırası ile  $p=0,106$ ,  $p=0,237$ ,  $p=0,680$ ).

Ki-67 proliferatif indeksi ile silin E1 ekspresyonu arasında anlamlı bir korelasyon mevcut değildir ( $r=0,142$ ,  $p=0,86$ ).

Siklin E1'in farklı prognostik parametrelerdeki ekspresyonunun oldukça farklı olduğu görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı hiçbir sonuç elde edilememiştir.



**Resim 3: (A)** Düşük dereceli ürotelyal karsinomda skor 2 (%25-50) ve **(B)** yüksek dereceli ürotelyal karsinomda skor 3 (%50-75) siklin E1 nükleer ekspresyonu (x200 ve x400).

#### 4.2.3. Rb

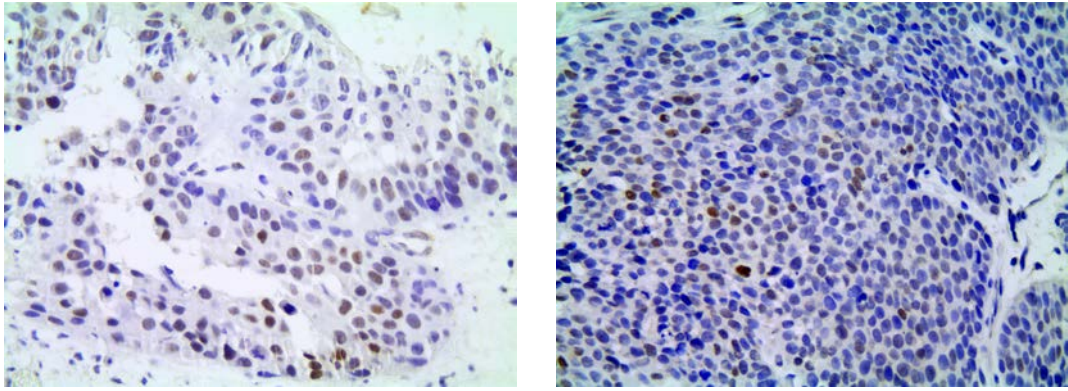
Nükleer Rb ekspresyonu yüksek dereceli tümörlerin 28 tanesinde (%62,2) düşük dereceli tümörlerin 34 tanesinde (%82,9) izlenmiştir (Resim 4). Rb ortalama immünreaktif skoru düşük dereceli tümörlerde 2,54, yüksek dereceli tümörlerde 1,78'dir. Düşük dereceli tümörlerde ekspresyonun daha yüksek olduğu görülmektedir ve bu sonuçlar istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ( $p=0,022$ ).

Patolojik evreye göre değerlendirildiğinde ise pT1 olgularda ortalama immünreaktif skor 2,12; kas invaziv olgularda ise 2,17'dir. tümör evresi ile Rb ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki mevcut değildir ( $p=0,932$ ). Boyanma yaygınlık ve şiddetine göre ayrıca bakıldığında da anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ( $p=0,653$ ,  $p=0,969$ ).

Rekürrens gösteren olgularda ortalama immünreaktif skor 2,23; rekürrens göstermeyen olgularda 1,82'dir. Rekürrens ile Rb ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki mevcut değildir ( $p=0,284$ ). Boyanma yaygınlık ve şiddetine göre bakıldığında yine rekürrens gösteren olgularda Rb ekspresyon değerlerinin daha yüksek olduğu görülmekle beraber sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p=0,216$ ,  $p=0,556$ ).

Progresyon gösteren olgularda Rb ortalama immünreaktif skoru 1,80; göstermeyen olgularda ise 2,39'dur. Lenf nodu metastazı bulunan olgularda Rb ortalama immünreaktif skoru 1,29; bulunmayanlarda ise 2,60'dır. Her iki kötü prognostik belirteçte Rb ekspresyonunun azalmış olduğu dikkati çekse de bu değerlerin hiçbiri istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p$  değerleri sırası ile  $p=0,600$ ,  $p=0,106$ ). Yine boyanma yaygınlık ve şiddetine görede anlamlı sonuçlar mevcut değildir.

Ki-67 proliferatif indeksi ile Rb ekspresyonu arasında anlamlı bir korelasyon mevcut değildir ( $r=-0,029$ ,  $p=0,745$ ).



**A**

**B**

**Resim 4: (A-B)** Yüksek dereceli ürotelyal karsinom olgularında skor 1 ( $\%<25$ ) nükleer Rb ekspresyonu (x400)

#### 4.2.4. E2F1

Nükleer E2F1 ekspresyonu yüksek dereceli tümörlerin 42 tanesinde ( $\%62,2$ ) düşük dereceli tümörlerin 33 tanesinde ( $\%82,9$ ) izlenmiştir (Resim 5). E2F1 ortalama immünreaktif skoru düşük gradeli tümörlerde 2,54; yüksek dereceli tümörlerde ise 3,22'dir ve bu değerler istatistiksel olarak da anlamlıdır ( $p=0,027$ ). Evre ile ilişkisine bakıldığında ise pT1'deki olguların ortalama immünreaktif skoru 2,93; kas invaziv

olguların ise 2,83'dür. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p=0,903$ ). Boyanma yaygınlığı ve şiddeti ayrıca değerlendirildiğinde yine evre ile anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ( $p=0,806$ ,  $p=0,834$ ).

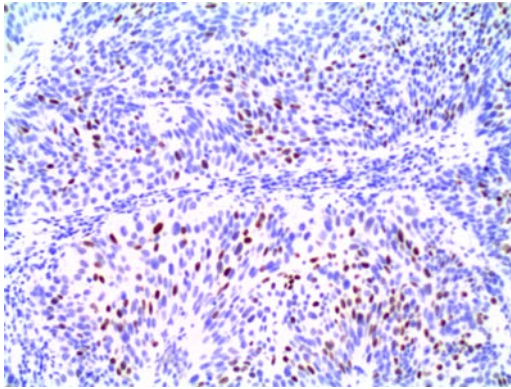
Rekürrens gösteren olgularda E2F1 ortalama immünreaktif skoru 3,23 iken göstermeyenlerde 2,09'dur ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p=0,006$ ).

Progresyon gösteren olgularda E2F1 ortalama immünreaktif skoru 3,80; göstermeyenlerde 2,70'dir. Bu değerler istatistiksel olarak anlamsızdır ( $p=0,173$ ).

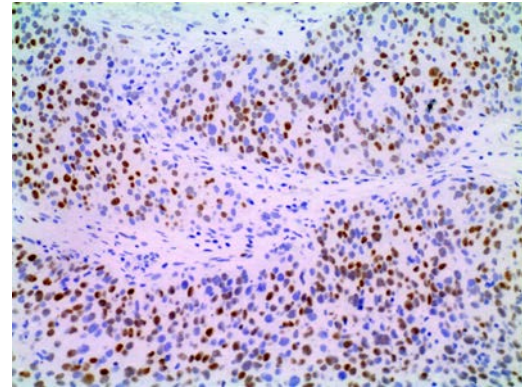
Lenf nodu metastazı bulunan olgularda E2F1 ortalama immünreaktif skoru 3,70; göstermeyenlerde ise 2,73'dür. Bu değerler de istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır ( $p=0,123$ ). Ancak boyanma yaygınlık ve şiddeti ayrı ayrı incelendiğinde lenf nodu metastazı gösteren olgularda boyanma yoğunluğundaki bu artışın anlamlı olduğu dikkati çekmiştir ( $p=0,026$ ).

E2F1'in Ki-67 ile olan ilişkisine bakıldığında boyanma yaygınlığı, şiddeti ve immünreaktif skoru ile Ki-67 ekspresyonları arasında anlamlı pozitif korelasyon olduğu görülmektedir (boyanma yaygınlığı  $r=0,478$ ,  $p<0,0001$ , boyanma şiddeti  $r=0,357$ ,  $p<0,0001$ , immünreaktif skor  $r=0,362$ ,  $p<0,0001$ ).

Bu değerlerden histolojik derece, progresyon, lenf nodu metastazı ve proliferatif indeks gibi prognostik parametrelerin hepsinde E2F1 ekspresyonunun artmış olduğu dikkati çekmektedir.



**A**



**B**

**Resim 5: (A)** Düşük decceli ürotelyal karsinomlu olguda, skor 1 ( $\%<25$ ) ve **(B)** yüksek dereceli olguda skor 3 ( $\%50-75$ ) nükleer E2F1 ekspresyonu (x200 ve x400).

#### 4.2.5. p27

Nükleer p27 ekspresyonu yüksek dereceli tümörlerin 43 tanesinde (%95,5) düşük dereceli tümörlerin 39 tanesinde (%95,1) izlendi (Resim 6). Ortalama immünreaktif skor düşük dereceli tümörlerde 5,02; yüksek derecelilerde 4,78'dir. İstatistiksel olarak bu sonuç anlamlı değildir ( $p=0,237$ ).

p27 ekspresyonunun evreye göre dağılımına baktığımızda pT1 tümörlerde ortalama immünreaktif skor 4,84; kas invaziv tümörlerde bu değer 5,0'dır. Bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p=0,896$ ).

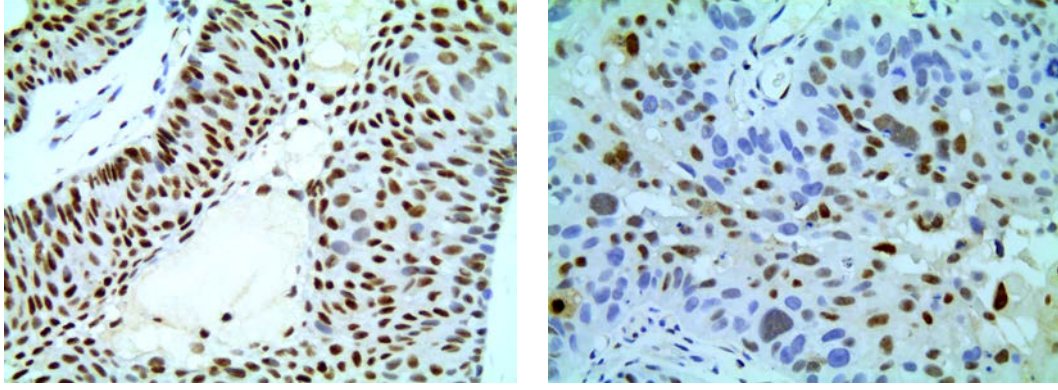
Rekürrens gösteren olgularda p27 ortalama immünreaktif skoru 4,79 iken; göstermeyenlerde bu değer 4,86'dır. p27 ekspresyonu ile rekürrens arasında anlamlı bir ilişki söz konusu değildir ( $p=0,733$ ).

Progresyon gösteren olgularda p27 ortalama immünreaktif skoru 5,80; göstermeyenlerde 4,82 olup istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p=0,335$ ).

Lenf nodu metastazı bulunan olgularda ortalama immünreaktif skor 4,14; bulunmayanlarda 5,07'dir. Bu değerlerde istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p=0,237$ ).

p27 ile Ki-67 ekspresyonları arasındaki ilişkiye bakıldığında zayıf pozitif bir korelasyon olduğu görülmektedir (boyanma yaygınlığı  $r=0,199$ ,  $p=0,032$ , boyanma şiddeti  $r=0,325$ ,  $p<0,0001$ , immünreaktif skor  $r=0,278$ ,  $p<0,0001$ ).

p27 boyanma yaygınlık ve şiddetine göre ayrı ayrı değerlendirildiğinde prognostik faktörlere göre değişik ekspresyon dağılımları izlense de hiçbir prognostik faktörlerle anlamlı ilişki bulunamamıştır.



**Resim 6: (A)** Düşük dereceli ürotelyal karsinomda skor 4 (%>75) ve **(B)** yüksek dereceli olguda skor 2 (%25-50) nükleer p27 ekspresyonu (x200 ve x400).

## 5.TARTIŞMA

Mesane karsinomları dünya çapında en sık görülen 6. kanserdir. İlk tanı anında olguların %70'ini yüzeysel mesane karsinomları oluşturur. Genelde prognoz iyidir, 5 yıllık sağ kalım ihtimali düşük dereceli olgularda % 90'ın üzerindedir. Ancak vakaların yaklaşık yarısı ilk bir yıl içinde nüks eder. Olguların % 20-25' ise kötü prognozla doğrudan ilişkili kas invaziv evre veya metastatik evreye progresyon gösterir. Bu evrede beklenen 5 yıllık sağ kalım ihtimali ise yaklaşık % 45-55'dir (1, 10). Bu bilgiler hastalık seyrini tahmin edebilecek bir biyolojik belirtecin önemini göstermektedir. Günümüzde kanser taraması, hastalık riskinin belirlenmesi, tanı, tedaviye yanıt ve prognozun belirlenmesi için kullanılan biyobelirteçler mevcuttur. Mesane kanserlerinde de halen prognostik değeri yüksek bir biomarkır arayışı sürmektedir. Bu konuda değişik protoonkogen ve tümör supresör genler ile çalışmalar yapılmaktadır. Bunlar içinde hücre siklusunda önemli rolleri olan genler özellikle merak uyandırmaktadır.

Hücre siklus anomalileri kanser büyümesinin temelini oluşturur ve kansere yol açan sebeplerin çoğu hücre siklusunu bozar. Çoğu tümörde hücre siklus kontrolü ortadan kalktığı için tümör hücreleri siklusa daha kolay ve olağan sınırlamalar olmaksızın girer. Mitra ve arkadaşları hücre siklusu ile bağlantılı markırların mesane kanserlerinde önemli role sahip moleküler sapmalar gösterdiğini düşünerek bu konuda yaptıkları çok sayıda çalışmada; kanser gelişimi ve ilerlemesinin bu markırlarla ilişkili olduğu sonucuna ulaşmışlardır (3-7).

Siklin D1, siklin E1, Rb, E2F1 ve p27 hücre siklusu düzenlenmesinde önemli role sahip protoonkogen ve tümör supresör gen özelliği taşıyan markırlardır. Bizde çalışmamızda mesane ürotelyal karsinomlarında bu gen ekspresyonlarının histolojik derece, patolojik evre, rekürrens, progresyon, lenf nodu metastazı ve Ki-67 proliferatif indeksi gibi prognostik önemi olan parametrelerle ilişkisini inceledik.

Siklin D1'in, meme, prostat, endometrium, over kanserlerinde ve baş-boyun bölgesi skuamöz hücreli karsinomlarında hücre siklusundaki düzenleyicilerin etkisinden kurtularak aşırı eksprese olduğu bilinmektedir. Siklin D1'in mesane karsinomlarındaki ilişkisini belirlemek için yapılan çalışmalarda oldukça çelişkili sonuçlar ortaya çıkmıştır. Daha önce yapılan bazı çalışmalar artmış siklin D1

ekspresyonunun progresyon ve rekürrens ile ilişkili olduğunu belirtirken (64-67) bazı çalışmalar da ise düşük siklin D1 ekspresyonunun, invazyon rekürrens ve lenf nodu metastazı gösteren olgularda görüldüğü sonucuna varılmıştır ( 67, 68).

Bizim çalışmamızda ise siklin D1'in yüksek dereceli ve kas invazyonu gösteren (pT2, pT3, pT4) olgularda daha düşük eksprese olduğu görülmüştür. Boyanma yaygınlığı ve şiddeti yönünden bakıldığında bu sonuçlar istatistiksel olarak da anlamlı değerlere tekabül etmektedir. Bu bulgular histolojik derece ve evre arttıkça siklin D1 seviyesinin azaldığını göstermektedir. Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da rekürrens, lenf nodu metastazı ve progresyon gösteren olgularda da siklin D1'in düşük seviyelerde ekspre olduğu dikkat çekicidir.

Siklin E1'in mesane karsinomlarındaki ekspresyonu da araştırma konularındandır. Literatürde sıklıkla siklin E1'in prognostik faktörlerle ilişkisi yanında siklin D1 ve hücre siklusunda görevli diğer genlerin ekspresyonları ile olan ilişkisi hakkında yayınlar mevcuttur. Shariat ve ark. yaptıkları çalışmada (69-71) siklin D1 ekspresyonunu herhangi bir patolojik özellik ile ilişkili bulmazken siklin E1 düşük ekspresyonunun ileri patolojik evre ve lenf nodu metastazı ile anlamlı bağlantısı olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Ayrıca düşük siklin E1 ekspresyonunun değişen Rb ve p27 ekspresyonları ile anlamlı ilişkisi olduğunu savunmuşlardır.

Bizim çalışmamızda rekürrens ve lenf nodu metastazı olan olgular ile kas invazyonu gösteren ileri patolojik evredeki olgularda siklin E1'in ortalama immün reaktif skorunun daha düşük olduğu görülmüştür. Bu değerler istatistiksel olarak anlamsız olsa da literatürdeki bilgilere paralel şekilde rekürrens, lenf nodu metastazı ve kas invazyonu bulunan olgularda düşük siklin E1 ekspresyonunun görülmesi dikkat çekicidir.

Rb insan kanserlerinde tanımlanan ilk tümör supresör gendir. Hipofosforile halde iken E2F ile sıkı bir kompleks oluşturarak hücre replikasyonunu önler. E2F1 ise DNA sentezi, onarım, mitoz ve apoptoz gibi farklı hücresel fonksiyonları düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Bu nedenle Rb fosforilasyonu ve Rb-E2F kompleksinin ayrışması hücre siklusunda anahtar rol oynar. Mesane kanserlerinde Rb ekspresyonu ile ilişkili değişik veriler mevcuttur. Kasa invazyon gösteren mesane tümörlerinin %30-80 kadarında Rb'nin inaktive olduğu gösterilmiştir (72-75). Rb delesyonları olan tümörlerde immünohistokimyasal olarak Rb ekspresyonunun

kaybolduğu, bunun kötü prognoz ve agresif seyir ile ilişkili olduğu saptanmıştır (37, 76). Ancak bazı yayınlarda artmış Rb ekspresyonundan bahsedilmektedir. İmmünohistokimyasal olarak kuvvetli ve homojen nükleer Rb ekspresyonunun inaktif hiperfosforile pRb'ye karşılık geldiği ve bunun siklin D1 aşırı ekspresyonu veya p16 delesyonu ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (7, 77).

Bizim çalışmamızda yüksek dereceli tümörlerde Rb ekspresyonunun daha düşük olduğu görülmüştür ve bu sonuç istatistiksel olarak da anlamlıdır. Bu sonuç mesane karsinomlarında Rb'nin tümör supresör özelliğinin ortadan kalkmasının daha yüksek histolojik derece dolayısıyla daha agresif seyirle ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

E2F gen değişikliklerinin hücresel çoğalma ve apoptozis içindeki rolü, hakkında deneysel modeller ve insan tümörlerinde sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. (78-80). Yakın zamanda Kim K. ve arkadaşlarının (81) 12 adet çoklu markırla yaptığı çalışmada özellikle yüksek E2F ekspresyonunun tümör progresyonu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Lee ve arkadaşlarının (82) RNA mikroarray analiz yöntemini kullanarak yaptığı çalışmada ise yüksek E2F ekspresyonunun kas invaziv tümörlerde daha yüksek olduğu görülmüştür.

Bizim çalışmamızda yüksek dereceli tümörlerde ve rekürrens gösteren olgularda E2F1 ekspresyonunun daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar istatistiksel olarak da anlamlıdır. İstatistiksel olarak anlamsız olsa da lenf nodu metastazı bulunan tümörlerde de E2F1 ekspresyonunun arttığı görülmektedir. Ayrıca E2F1 ile Ki-67 proliferatif indeksi arasında anlamlı pozitif bir korelasyon mevcuttur. Çalışmada yüksek dereceli tümörlerde düşük Rb ekspresyonu görülmesinide göz önüne aldığımızda Rb'nin azalması ile E2F1'in serbest kalarak ekspresyonunun arttığını söylemek mümkündür. E2F1'in artışı da hücreyi proliferasyona yönelterek kötü prognoza yol açmaktadır.

p27, bir siklin bağımlı kinaz inhibitörüdür ve tümör supresör gendir. Hücre siklusunda siklin E-CDK2 kompleksini inhibe ederek G1-S geçişini düzenler. Düşük p27 seviyeleri antiproliferatif rol kaybına ve hücrelerin anormal çoğalmasına sebep olmaktadır. Düşük p27 ekspresyonu mesane kanseri dahil olmak üzere çeşitli malign tümörlerde kötü prognostik faktör olarak öne sürülmüştür (83-85). Kim K ve

arkadaşları (81) yaptıkları çalışmada literatürdeki bilgilere zıt olarak invaziv mesane karsinomlarında nükleer p27 ekspresyonunun artmış olduğunu belirtmektedir.

Bizim çalışmamızda yüksek dereceli tümörlerde, rekürrens ve lenf nodu metastazı gösteren olgularda p27 nükleer ekspresyonunun daha düşük olduğu görüldü. Bunun yanı sıra kas invazyonu ve progresyon gösteren olgularda p27 ekspresyon değerleri daha yüksekti. Bu verilerin hiç biri istatistiksel olarak anlamlı değerlere tekabül etmemektedir. p27 geninin işlevini göz önüne aldığımızda kötü prognostik faktörlerle birlikte düşük ekspresyon değerleri beklenen bir bulgudur. Ancak bizim çalışmamızda prognostik faktörlerle p27 ekspresyonları arasında anlamlı bir sonuca ulaşamamıştır.

Mesane kanserlerinde progresyon ile ilişkili bulunan en istikrarlı faktör tümör hücrelerinin bölünme hızıdır. Çalışmalarda, özellikle düşük dereceli tümörlerde, progresyonu öngörmeye yüksek mitotik aktivitenin önemli risk faktörü olduğu ileri sürülmüştür (86-90). Ki-67 ile yapılan çalışmalarda, düşük dereceli tümörlerde Ki-67 pozitif hücrelerin oranı immünohistokimyasal olarak belirlenmiş ve benzer sonuçlar elde edilmiştir (91). Kas invazyonu göstermeyen ürotelyal kanserlerde de Ki-67 indeksinin progresyonla ilişkisi gösterilmiştir (92, 93). Yine benzer şekilde yakın zamanda yapılan çalışmalar Ki-67 proliferatif indeksinin histolojik derece ve patolojik evre ile korele olduğu ve yüzeyel mesane tümörlerinde rekürrensi tahmin etmede Ki -67'nin önemli bir markır olduğundan bahsedilmektedir (93-96).

Ki-67 proliferatif indeksinin prognostik önemi kanıtlanmıştır. Bizim çalışmamızda da rekürrens gösteren olgularda Ki-67 indeksi istatistiksel olarak da anlamlı düzeyde daha yüksektir. Biz Ki-67'nin diğer markırlarla olan korelasyonunu inceledik. Çalışmamızda E2F1 ve p27 boyanma şiddeti, yaygınlığı ve immünreaktif skoru ile Ki-67 arasında anlamlı pozitif bir korelasyon olduğu görülmüştür. E2F1 proliferasyonu arttırıcı bir onkogendir ve Ki-67 ile pozitif korelasyonu beklenen bir sonuçtur. p27 ise supresör bir gendir ve p27 azlığının proliferasyonu normalde arttırması beklenir. Burda ise yüksek çıkmıştır. Bu durum E2F1'in artışı ile kontrolsüz şekilde çoğalmaya başlayan normal fonksiyona sahip henüz mutasyona uğramamış p27 geni artarak proliferasyonu sınırlamaya çalışıyor olabilir şeklinde yorumlanmıştır.

Hücre siklusunda önemli rolleri olan çalışmamızda konusunu oluşturan markırların mesane karsinomlarındaki ekspresyonları ve bunların prognostik faktörlerle olan ilişkisi yukarıda tek tek ele alınmıştır. Ancak geleneksel tek markır çalışmaları her ne kadar ürotelyal karsinogeneze ışık tutacak olsa da hiçbir biomarkırın tek başına prognostik belirteç olarak klinik kullanımı henüz kanıtlanamamıştır. Yapılan bazı çalışmalarda birden çok markırın kombine kullanımının prognozu tahmin etmede ve hastalara bireysel tedavi rejimlerinin düzenlenmesinde daha faydalı olacağı sonucu ortaya atılmıştır (4-8, 69, 70, 81, 97 ). Shariat ve ark.'nın (98) değişik biomarkır kombinasyonları ile bu konuda çok sayıda çalışmaları bulunmaktadır. p53, p21, p27 ve Rb ile yaptıkları çalışmada p53, p27 ve Rb nin patolojik evre, lenfovasküler invazyon ve lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu sonucuna vardılar. Çalışmada kullandıkları her biyobelirtecın tek tek, ikili ve değişik kombinasyonlarının mesane kanseri ölüm oranıyla anlamlı bir ilişkisi olduğunu belirterek p53, p21, p27 ve Rb genlerinin mesane ürotelyal karsinomunun biyolojik davranışında sinerjistik/kooperatif rolü olduğunu savundular. Yine Shariat ve arkadaşlarının yaptığı başka çalışmalarda (69, 70) düşük siklin E1 ekspresyonunun siklin D1, Rb ve p27 ekspresyonları ile anlamlı korelasyonu olduğunu ve radikal sistektomi sonrası hastaların takibi ve adjuvan tedavilerin belirlenmesinde bu sonuçların yardımcı olabileceğı belirtilmiştir. Lenz ve ark. (99) yaptıkları çalışmada ürotelyal karsinom ile hücre siklusu proteinleri olan p53, p63, p16 ve Ki-67 ile prognostik faktörler arasında anlamlı bir ilişkisi olduğunu ancak Rb ve siklin D1 ile anlamlı sonuçlar elde edilemediğini belirterek, mesane karsinomlarında hastalığın progresyonunda hücre siklusunda görevli genlerin ekspresyonlarının önemli değışkenlik gösterdiğini, prognostik ve terapatik hedeflerin belirlenmesinde daha ileri çalışmaların yararlı olacağı kanaatini bildirdiler. Korkolopoulou ve arkadaşları çalışmalarında (100) p27 ekspresyonunun; düşük stageli yüzeyel (Ta-T1) mesane karsinomlarında anlamlı yüksek olduğunu, kötü diferansiye kas invaziv ürotelyal karsinomlarda ise belirgin derecede düşük olduğunu göstermişlerdir. Daha da önemlisi, kombine Ki-67/p27 ekspresyonlarının kas invaziv ürotelyal karsinomlarda hayatta kalma süresi ile ilgili olarak, geleneksel parametreler ya da diğer hücre siklus proteinleri tarafından sağlanan verilerin ötesinde prognostik bilgi sağladığı sonucuna vardılar.

Bizde çalışmamızda mevcut markırların birbirleri ile korelasyonunu ve bunların prognostik faktörlerle olan ilişkisini inceledik.

Bizim çalışmamızda Rb ekspresyonu ile siklin D1 ekspresyonu arasında boyanma yaygınlık dereceleri açısından istatistiksel olarak zayıf da olsa pozitif korelasyon olduğu dikkati çekmiştir. Bu bulgu literatürdeki hiperfosforile inaktif Rb'nin siklin D1 artışına sebep olduğu bilgisini doğrular niteliktedir (7, 77). Bunun yanında E2F1 boyanma değerleri ile siklin E1 ve p27 boyanma değerleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir korelasyon mevcuttur. Ancak E2F1 siklin E ve p27'nin aksine yüksek gradeli ve rekürrens gösteren olgularda istatistiksel olarak da anlamlı değerlere tekabül eden daha fazla ekspresyon gösterdiği görülmektedir. Lee ve arkadaşlarının (82) RNA mikroarray yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada da kas invazyonu gösteren tümörlerde E2F ekspresyonunun daha yüksek olduğu görülmüştür. Benzer şekilde ki-67 boyanma şiddeti, yaygınlığı ve toplam immünreaktif skoru ile E2F1 boyanma değerleri arasında da pozitif korelasyon mevcuttur. Buda progresyon arttıkça E2F1 değerlerinin yükselmekte olduğu verilerini desteklemektedir. Bu durum daha önce Ki-67 ile p27 korelasyonunda tartışıldığı gibi normal fonksiyona sahip henüz mutasyona uğramamış p27'nin karsinogenezi ve artan E2F1 değerlerini kontrolde tutabilmek için bir artış gösterdiğini, tümörde normalden daha yüksek seviyelerde olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak hücre siklusunda görevli genlerin ekspresyon profilleri oldukça heterojen olsa da mesane karsinomu patogenezinde sinerjistik/kooperatif rolleri olduğu ortadadır. Bizim çalışmamızda yüksek dereceli tümörlerde siklin D1 ve Rb ekspresyonu azalırken, E2F1 ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Benzer şekilde kas invazyonu gösteren tümörlerde siklin D1'in düşük eksprese olmaktadır. E2F1 rekürrensi tahmin etmede faydalı olabileceği gibi kötü prognozu gösteren önemli bir belirteç olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda hücre siklusundaki birliktelikleri göz önüne alındığında Rb seviyesindeki düşüklüğünün E2F1'in artmasına yol açması beklenen bir bulgudur. Bu iki markırın bir arada kombine prognostik markır olarak kullanılması daha anlamlı ve belirleyici olacaktır.

## 6. SONUÇ

2004-2013 yılları arasında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilimdalı'nda incelen 86 mesane ürotelyal karsinomlu olgu çalışma kapsamına alındı. Olgular sistektomi ve TUR materyalleri arasından seçildi. Bu çalışmada siklin D1, siklin E1, Rb, E2F1 ve p27'nin prognostik önemi kanıtlanmış grade, stage, rekürrens, progresyon lenf nodu metastazı ve Ki-67 proliferatif indeksi gibi parametrelerle ilişkisi araştırıldı.

Çalışma grubumuzu oluşturan 86 olgunun 78 tanesi erkek 8 tanesi kadındır. Bu değerler literatürle uyumlu olarak mesane karsinomunun erkeklerde kadınlara göre çok daha sık görüldüğünü doğrulamaktadır. Mesane karsinomu sıklıkla ileri yaş grubunda görülen bir hastalıktır. Bu çalışmadaki hastaların yaşları bu zamana kadar ki istatistiksel verilerle uyumlu olarak 46 ile 88 arasında değişmektedir ve ortalama yaş 66'dır.

Hastaların 41 tanesi düşük dereceli, 45 tanesi yüksek dereceli ürotelyal karsinomdur. Düşük dereceli karsinomların sadece 2 tanesi pT2, yüksek dereceli karsinomların ise 20 tanesi pT2'dir. Bu düşük dereceli tümörlerin daha çok yüzeysel tümörler olduğu bilgisini desteklemektedir.

Farklı evre ve derecedeki tümörlerde siklin D1, siklin E1, Rb, E2F1 ve p27 immünohistokimyasal ekspresyonlarının değişken olması karsinogenezde hücre siklusundaki normalden sapmaların rolü olduğunu desteklemektedir. Bu markırların korelasyonlarına bakıldığında siklin D1 ve Rb arasında pozitif bir korelasyon olduğu benzer şekilde E2F1 ve p27 arasında da zayıf pozitif korelasyon olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar mesane karsinomlarında bu genlerin sinerjistik bir etkisi olduğunu göstermektedir.

Yüksek dereceli tümörlerde siklin D1 ve Rb ekspresyonu azalırken; E2F1 ekspresyonunu arttığı görülmüştür. Bu sonuçta hücre siklusundaki rolleri göz önüne alındığında bu genlerin karsinogenezde sinerjistik etkisini destekler niteliktedir.

Kas invazyonu gösteren ileri evre tümörlerde siklin D1 ekspresyonu azalmaktadır. Çalışmamızda diğer markırların lamina propria invazyonu gösteren tümörler ile kas invazyonu gösteren tümörler arasında ekspresyon farklılığı

gösterdiği görülse de siklin D1 dışında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara tekabül eden bir ilişki bulunamamıştır.

E2F1'in histolojik derece, rekürrens ve Ki-67 proliferatif indeksi ile anlamlı ilişkisi mevcuttur. Elde edilen sonuçlar yüksek E2F1 ekspresyonunun rekürrens ve kötü prognozu tahmin etmede önemli bir bulgu olduğunu göstermektedir.

Lenf nodu metastazı gösteren olgularda bazı markırların seviyelerinde, diğer prognostik faktörlerdeki ekspresyonları ile uyumlu değişiklikler izlense de istatistiksel olarak hiçbir anlamlı sonuç elde edilememiştir. Ancak bizim çalışmamızda lenf nodu metastazı gösteren olgu sayısı sadece 7 tanedir ve oldukça azdır. Daha geniş serilerle yapılacak çalışmalarda lenf nodu metastazının bu genlerle olan ilişkisinin netlik kazanacağını düşünmekteyiz.

## 7. KAYNAKLAR

- 1- Lamm D, Persad R, Brausi M, Buckley R, Witjes JA, Palou J, Böhle A, Kamat AM, Colombel M, Soloway M. Defining progression in nonmuscle invasive bladder cancer: it is time for a new, standard definition. *J Urol*. 2014; 191: 20–27
- 2- Kassouf W, Black PC, Tuziak T, Bondaruk J, Lee S, Brown GA, Adam L, Wei C, Baggerly K, Eli MA, McConkey D, Czerniak B, Dinney CP. Distinctive expression pattern of ErbB family receptors signifies an aggressive variant of bladder cancer. *J Urol*. 2008; 179: 353-8.
- 3- Mitra AP, Cote RJ. Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009; 4: 251–85
- 4- Mitra AP, Quinn DI, Dorff TB, Skinner EC, Schuckman AK, Miranda G, Gill IS, Daneshmand Es. Factors influencing post-recurrence survival in bladder cancer following radical cystectomy. *BJU Int*. 2012;109: 846–54.
- 5- Mitra AP, Datar RH, Cote RJ. Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression and target identification. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 5552-64
- 6- Mitra AP, Almal AA, George B, et al. The use of genetic programming in the analysis of quantitative gene expression profiles for identification of nodal status in bladder cancer. *BMC Cancer*. 2006; 6: 159.
- 7- Mitra AP, Hansel DE, Cote RJ. Prognostic value of cell-cycle regulation biomarkers in bladder cancer. *Semin Oncol*. 2012; 39: 524-33
- 8- Dancik GM1, Theodorescu D2. Robust prognostic gene expression signatures in bladder cancer and lung adenocarcinoma depend on cell cycle related genes. *PLoS One*. 2014; 9(1): e85249.
- 9- Sternberg SS, *Histology for Pathologist* New York Lippincott-Raven Press. 1997 2nded. 835-47
- 10- Rosai J. *Urinary Tract*. In *Ackermann's Surgical Pathology*, 9th ed. Mosby 2004: 1317-1359
- 11- Odar V. *Anatomi ders kitabı*, 7. baskı Ankara, 1972: 264 -77
- 12- Murphy W M, Beckwith JB, Farrow GM. Tumors of the urinary bladder. In *Tumors of the kidney, bladder and related urinary structures*, 3rd ed. AFIP 1994; 193 -275
- 13- *Urinary Bladder; Urinary organs and generative system*. Atlas of Embryology, Atlas of Human Morfology. Diamedinfo 1997
- 14- Lippincott Williams&Wilkins VER. *Histology for pathologists*; 2007.
- 15- Fuchs E, Horsley V. More than one way to skin. *Genes Dev* 2008; 22: 976-85.
- 16- Philip AT, Amin MB, Tamboli P, Lee TJ, Hill CE, Ro JY. Intravesical adipose tissue: a quantitative study of its presence and location with implications for therapy and prognosis. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 1286-90.
- 17- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman DD, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136: E359–86

- 18- Society AC. Cancer facts and figures. American Cancer Society. Atlanta, Georgia; 2009.
- 19- Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı İstatistikleri. Türkiyede Kanser Kayıtlılığı ve DünyaKanser İstatistikleri. <http://www.kanser.gov.tr/daire-faaliyet/kanseristatistikleri.html>.
- 20- International Agency for Research on Cancer (IARC), Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, World Health Organization Classification of Tumours, Edited by John N. Eble, Guido Sauter, Jonathan I. Epstein, Isabell A. Sesterhenn 2004, chapter: 2, 89-120
- 21- Pashos LC, Botteman MF, Laskin LB, Redaelli A: Bladder Cancer Cancer Practice November/December 2002; 10; 6
- 22- Johansson SL, Cohen SM. Epidemiology and etiology of bladder cancer. Semin Surg Oncol 1997;13: 291-8.
- 23- Negri E, La Vecchia C. Epidemiology and prevention of bladder cancer. Eur J Cancer Prev 2001;10: 7-14.
- 24- Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 2004; 83:1-1438
- 25- Dietrich H, Dietrich B. Ludwig Rehn (1849-1930)--pioneering findings on the a etiology of bladder tumours. World J Urol 2001; 19: 151-3.
- 26- Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum Suppl 1987; 7: 1-440.
- 27- Campell Üroloji 8.Baskı Walsh PC, Retik AB, Vaughan DE, Wein AJ. 2005 Saunders Company Cilt 4
- 28- Sternberg S.S. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology 4th ed. Vol 3. Philadelphia, Lippincott Williams &Wilkins 2004; 2035-2081.
- 29- Van Rijn BWG, Van der Kwast TH, Vis AN. FGFR3 and p53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma. Cancer Res 2004; 64: 1911-14
- 30- Linn JF, Sesterhenn I, Mostofi FK. The molecular caharacteristics of bladder cancer in young patients. J Urol 1998; 159: 1493 -96
- 31- Hartmann A, Moser K, Kriegmair M. Frequent genetic alterations in simple urothelial hiperplasias in patients with papillary urothelial carcinoma. Am J Path 1999; 154: 721 -27
- 32- Tiguert R, Fradet Y. New diagnostic tools in bladder cancer. Current Opinion in Urology 2002; 12: 239 -43
- 33- Rosai J. Carcinoma, Bladder. İn: Rosai J, editor. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology 9th ed. Mosby; Bladder, 2004. Vol: 1 1327-1341
- 34- Mills Stacey E. İn: Carter D, Joel K, Oberman GHA, Reuter V, Stoler MH. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology 4th ed. 2004 vol:3, 2035-2074
- 35- Oosterlinck W, Meijden AV, Sylvester R, Böhle A, Rintala E, Narvón ES, Lobel B: Guidelines on Ta-T1 (Non-muscle invasive) Bladder Cancer. EAU. European Association of Urology 2006:1-13

- 36- Sauter G AF, Amin MB, Eble JN, et al. World Health Organization classification of tumours pathology and genetics: tumours of the urinary system and male genital organs. International Agency for Research on Cancer (IARC); 2004.
- 37- William M. Murphy. Urological Pathology, Disease of the urinary bladder, uretra, ureters and renal pelves, 2th ed. 1997, chapter: 2, 34-147
- 38- Cordon-Cardo C, Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression.1: Scand J Urol Nephrol Suppl. 2008 Sep; (218): 154-65
- 39- Lopez JI, Angulo JC, Growth pattern in superficial urothelial bladder carcinomas. Histological review and clinical relevance. Int Urol Nephrol DOI10.1007/s11255-0009-9537
- 40- Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. International Agency for Research on Cancer (IARC), Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, World Health Organization Classification of Tumours, 2004, chapter: 2, 89-120
- 41- Moyano Calvo JL, Gutierrez Gonzalez M, Perez-Lanzac Llorca A, Molina Carranza A, Alvarez-Ossorio Fernandez JL, Sanchez Sanchez E, Castineiras Fernandez J. Age's influence in superficial bladder cancer's behaviour. Actas Urol Esp 2005; 29: 82-8.
- 42- Lopez-Beltran A, Bassi P, Pavone-Macaluso M, Montironi R: Handling and Pathology Reporting of Specimens with Carcinoma of the Urinary Bladder, Ureter and Renal Pelvis. European Urology 2004; 45: 257–266
- 43- Hakomori S. Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. Cancer Res 1985; 45: 2405-2414.
- 44- Coon JS, Weinstein RS, Summers JL. Blood group precursor T-antigen expression in human urinary bladder carcinoma. Am J Clin Pathol 1982; 77: 692-699.
- 45- Huben RP. Tumor markers in bladder cancer. Urology 1984; 23: 10-14.
- 46- Malmstrom PU, Busch C, Norlen BJ, Andersson B. Expression of ABH blood group isoantigen as a prognostic factor in transitional cell bladder carcinoma. Scand J Urol Nephrol 1988; 22: 265-70.
- 47- Koss LG, Czerniak B, Herz F, Wersto RP. Flow cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors: a critical appraisal. Hum Pathol 1989; 20: 528
- 48- Schapers RF, Ploem-Zaaijer JJ, Pauwels RP, Smeets AW, Van Den Brandt PA, Tanke HJ, Bosman FT. Image cytometric DNA analysis in transitional cell carcinoma of the bladder. Cancer 1993; 72: 182-9
- 49- Melamed MR. Flow cytometry of the urinary bladder. Urol Clin N Am 1984;11: 599-608.
- 50- Mora LB, Nicosia SV, Pow-Sang JM, Ku NK, Diaz JI, Lockhart J, Einstein A. Ancillary techniques in the follow up of transitional cell carcinoma: a comparison of cytology, histology and deoxyribonucleic acid image analysis cytometry in 91 patients. J.Urol 1996; 156: 49-54
- 51- Oosterhuis JW, Schapers RF, Janssen-Heijnen ML, Smeets AW, Pauwels RP. MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder: clinical significance and comparison with other prognostic factors. Cancer 2000; 88: 2598-605.
- 52- T Otto, A Bex, U Schmidt, A Raz, H Rubben. Improved prognosis assessment for

- patients with bladder carcinoma. American Journal of Pathology 1997. Vol 150, 1919-23
- 53- Thomas DJ, Robinson MC, Charlton R, Wilkinson S, Shenton BK, Neal DE. P53 expression, ploidy and progression in pT1 transitional cell carcinoma of the bladder. Br J Urol. 1994; 73: 533-7
  - 54- Moch H, Sauter G, Moore D, Mihatsch MJ, Gudat F, Waldman F. p53 and erbB-2 Protein overexpression are associated with early invasion and metastasis in bladder cancer. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1993; 423: 329-34.
  - 55- Moch H, Sauter G, Mihatsch MJ, Gudat F, Epper R, Waldman FM. p53 but not erbB-2 expression is associated with rapid tumor proliferation in urinary bladder cancer. Hum Pathol. 1999 Dec; 25: 1346-51.
  - 56- Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Neoplazi. Robbins Temel Patoloji, 7nci baskı. Nobel Tıp Kitabevleri İstanbul 2003; 6: 165 -210.
  - 57- Cooper GM, Hausman RE, Hucre: Molekuler Yaklaşım. 3. Baskı, İzmir Tıp Kitabevi, 2006
  - 58- Kawahara M, Kammori M, Kanauchi H, et al: Immunohistochemical prognostic indicators of gastrointestinal carcinoid tumours. Eur J Surg Oncol 2002; 28: 140-146.
  - 59- Lipponen P, Eskelinen M. Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long-term prognosis. Br J Cancer 1994; 69: 1120-5.
  - 60- Messing EM. Growth factors and bladder cancer: clinical implications of the interactions between growth factors and their urothelial receptors. Semin Surg Oncol 1992; 8: 285-92
  - 61- Coogan CL, Estrada CR, Kapur S, Bloom KJ. HER-2/neu protein overexpression and gene amplification in human transitional cell carcinoma of the bladder. Urology 2004; 63: 786-90.
  - 62- Memon AA, Sorensen BS, Melgard P, Fokdal L, Thykjaer T, Nexø E. Expression of HER3, HER4 and their ligand heregulin-4 is associated with better survival in bladder cancer patients. Br J Cancer 2004; 91: 2034-41.
  - 63- Ching CB, Hansel DE. Expanding therapeutic targets in bladder cancer: the PI3K/Akt/mTOR pathway. Lab Invest 2010; 90: 1406-14.
  - 64- Lee CC, Yamamoto S, Morimura K, Wanibuchi H, Nishisaka N, Ikemoto S, Nakatani T, Wada S, Kishimoto T, Fukushima S. Significance of cyclin D1 overexpression in transitional cell carcinomas of the urinary bladder and its correlation with histopathologic features. Cancer. 1997; 79: 780–789.
  - 65- Yuan L, Gu X, Shao J, Wang M, Zhu Q, Zhang Z. Cyclin D1 G870A polymorphism is associated with risk and clinicopathologic characteristics of bladder cancer. DNA Cell Biol. 2010; 29: 611–617.
  - 66- Kim CJ, Nishi K, Isono T, Okuyama Y, Tambe Y, Okada Y, Inoue H. Cyclin D1b variant promotes cell invasiveness independent of binding to CDK4 in human bladder cancer cells. Mol Carcinog 2009; 48: 953–964
  - 67- Ren B, Li W, Yang Y, Wu S. The impact of cyclin D1 overexpression on the prognosis of bladder cancer: a meta-analysis. World J Surg Oncol 2014; 12: 55.

- 68- Kopparapu PK, Boorjian SA, Robinson BD, Downes M, Gudas LJ, Mongan NP, Persson JL. Expression of cyclin D1 and its association with disease characteristics in bladder cancer. *Anticancer Res.* 2013; 33: 5235-42
- 69- Shariat SF, Ashfaq R, Sagalowsky AI, et al. Correlation of cyclin D1 and E1 expression with bladder cancer presence, invasion, progression, and metastasis. *Hum Pathol.* 2006; 37: 1568-76
- 70- Shariat SF1, Chade DC, Karakiewicz PI, Ashfaq R, Isbarn H, Fradet Y, Bastian PJ, Nielsen ME, Capitanio U, Jeldres C, Montorsi F, Lerner SP, Sagalowsky AI, Cote RJ, Lotan Y. Combination of multiple molecular markers can improve prognostication in patients with locally advanced and lymph node positive bladder cancer. *J Urol.* 2010; 183: 68-75
- 71- Shariat SF, Karakiewicz PI, Ashfaq R, et al. Multiple biomarkers improve prediction of bladder cancer recurrence and mortality in patients undergoing cystectomy. *Cancer.* 2008; 112: 315–25
- 72- Ioachim E, Charchanti A, Stavropoulos NE, Skopelitou A, Athanassiou ED, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of retinoblastoma gene product (Rb), p53 protein, MDM2, c-erbB-2, HLA-DR and proliferation indices in human urinary bladder carcinoma. *Histol Histopathol* 2000; 15: 721-7
- 73- Cairns P, Proctor AJ, Knowles MA. Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. *Oncogene* 1991; 6: 2305-9.
- 74- Logothetis CJ, Xu HJ, Ro JY, et al. Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1256-61.
- 75- Wright C, Thomas D, Mellon K, Neal DE, Horne CH. Expression of retinoblastoma gene product and p53 protein in bladder carcinoma: correlation with Ki67 index. *Br J Urol* 1995; 75: 173-9.
- 76- Cordon-Cardo C, Waringer D, Petrylak D, et al. Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1251-6.
- 77- Hernando E, Nahle Z, Juan G, et al. Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature* 2004; 430: 797-802.
- 78- Zacharatos P, Kotsinas A, Evangelou K, Karakaidos P, Vassiliou LV, Rezaei N, Kyroudi A, Kittas C, Patsouris E, Papavassiliou AG, Gorgoulis VG. Distinct expression patterns of the transcription factor E2F-1 in relation to tumour growth parameters in common human carcinomas. *J Pathol* 2004; 203: 744-53.
- 79- Carro MS, Spiga FM, Quarto M, Di Ninni V, Volorio S, Alcalay M, Müller H. DEK Expression is controlled by E2F and deregulated in diverse tumor types. *Cell Cycle.* 2006; 5: 1202-7.
- 80- Rabbani F, Richon VM, Orlow I, Lu ML, Drobnjak M, Dudas M, Charytonowicz E, Dalbagni G, Cordon-Cardo C. Prognostic significance of transcription factor E2F-1 in bladder cancer: genotypic and phenotypic characterization. *J Natl Cancer Inst.* 1999 May 19; 91: 874-81
- 81- Kim K, Cho YM, Park BH, Lee JL, Ro JY, Go H, Shim JW. Histological and immunohistochemical markers for progression prediction in transurethrally resected high-grade non-muscle invasive bladder cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2015 1; 8: 743-50

- 82- Lee JS, Leem SH, Lee SY, Kim SC, Park ES, Kim SB, Kim SK, Kim YJ, Kim WJ, Chu IS. Expression signature of E2F1 and its associated genes predict superficial to invasive progression of bladder tumors. *J. Clin. Oncol* 2010; 28: 2660-7
- 83- Mitra AP, Hansel DE, Cote RJ. Prognostic value of cell-cycle regulation biomarkers in bladder cancer. *Semin Oncol* 2012; 39: 524-33
- 84- Rabbani F, Koppie TM, Charytonowicz E, Drobnjak M, Bochner BH, Cordon-Cardo C. Prognostic significance of p27Kip1 expression in bladder cancer. *BJU Int.* 2007; 100: 259-63
- 85- Wander SA, Zhao D, Slingerland JM. p27: a barometer of signaling deregulation and potential predictor of response to targeted therapies. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 12-8
- 86- Lipponen PK, Eskelinen MJ, Jauhiainen K, Terho R, Nordling S. Proliferation indices as prognostic factors in papillary Ta-T1 transitional cell bladder tumours. *Br J Urol* 1993;72: 451-7.
- 87- Oosterhuis JW, Schapers RF, Janssen-Heijnen ML, Smeets AW, Pauwels RP. MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder: clinical significance and comparison with other prognostic factors. *Cancer* 2000; 88: 2598-605.
- 88- Otto T, Bex A, Schmidt U, Raz A, Rubben H. Improved prognosis assessment for patients with bladder carcinoma. *Am J Pathol* 1997; 150: 1919-23.
- 89- Pich A, Chiusa L, Formiconi A, et al. Proliferative activity is the most significant predictor of recurrence in noninvasive papillary urothelial neoplasms of low malignant potential and grade 1 papillary carcinomas of the bladder. *Cancer* 2002; 95: 784-90.
- 90- Suwa Y, Takano Y, Iki M, Asakura T, Noguchi S, Masuda M. Prognostic significance of Ki-67 expression in transitional cell bladder carcinoma after radical cystectomy. *Pathol Res Pract* 1997; 193: 551-6.
- 91- Mulder AH, Van Hootegeem JC, Sylvester R, et al. Prognostic factors in bladder carcinoma: histologic parameters and expression of a cell cycle-related nuclear antigen (Ki-67). *J Pathol* 1992; 166: 37-43
- 92- Burger M, van der Aa MN, van Oers JM, et al. Prediction of progression of non-muscle-invasive bladder cancer by WHO 1973 and 2004 grading and by FGFR3 mutation status: a prospective study. *Eur Urol* 2008; 54: 835-43.
- 93- Lopez-Beltran A, Luque RJ, Alvarez-Kindelan J, et al. Prognostic factors in survival of patients with stage Ta and T1 bladder urothelial tumors: the role of G1-S modulators (p53, p21Waf1, p27Kip1, cyclin D1, and cyclin D3), proliferation index, and clinicopathologic parameters. *Am J Clin Pathol* 2004; 122: 444-52.
- 94- Goyal S, Singh UR, Sharma S, Kaur N. Correlation of mitotic indices, AgNor count, Ki-67 and Bcl-2 with grade and stage in papillary urothelial bladder cancer. *Urol J* 2014; 3; 11: 1238-47.
- 95- Ding W, Gou Y, Sun C, Xia G, Wang H, Chen Z, Tan J, Xu K, Qiang D. Ki-67 is an independent indicator in non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC); combination of EORTC risk scores and Ki-67 expression could improve the risk stratification of NMIBC. *Urol Oncol* 2014; 32: 42

- 96- Wang L1, Feng C, Ding G, Ding Q, Zhou Z, Jiang H, Wu Z. Ki67 and TP53 expressions predict recurrence of non-muscle-invasive bladder cancer. *Tumour Biol.* 2014; 35: 2989-95.
- 97- Wang L1, Feng C, Ding G, Zhou Z, Jiang H, Wu Z. Relationship of TP53 and Ki67 expression in bladder cancer under WHO 2004 classification. *J BUON* 2013; 18: 420-4.
- 98- Shariat SF, Ashfaq R, Sagalowsky AI, et al. Predictive value of cell cycle biomarkers in nonmuscle invasive bladder transitional cell carcinoma. *J Urol.* 2007; 177: 481-7
- 99- Lenz P1, Pfeiffer R, Baris D, Schned AR, Takikita M, Poscablo MC, Schwenn M, Johnson A, Jones M, Kida M, Cantor KP, Rothman N, Silverman DT, Hewitt SM, Moore LE. Cell-cycle control in urothelial carcinoma: large-scale tissue array analysis of tumor tissue from Maine and Vermont. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012; 21: 1555-64
- 100- Korkolopoulou P, Christodoulou P, Konstantinidou AE, et al. Cell cycle regulators in bladder cancer: A multivariate survival study with emphasis on p27Kip1. *Hum Pathol.* 2000;31(6):751-60